



Universidade Federal De São Paulo
Instituto do Mar - Imar
Campus Baixada Santista – Unidade Carvalho de Mendonça

Trabalho de Conclusão de Curso

Cultivo da microalga *Dunaliella salina* (BMAK 116) em efluente de tanques de carcinicultura que empregam o Sistema de Bioflocos BFT

Orientador: Prof. Dr. José Juan Barrera-Alba

Discente: Marcos Vinícius Pereira Borges de Campos

Santos, 2019

Universidade Federal De São Paulo
Instituto do Mar - Imar
Campus Baixada Santista – Unidade Carvalho de Mendonça

**Cultivo da microalga *Dunaliella salina* (BMAK 116) em
efluente de tanques de carcinicultura que empregam o
Sistema de Bioflocos BFT**

Monografia apresentada como requisito parcial de
Conclusão de Curso para obtenção do grau de
Bacharel em Engenharia Ambiental, sob orientação
do Professor Dr. José Juan Barrera-Alba.

Marcos Vinícius Pereira Borges de Campos

Santos, 2019

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado com os dados fornecidos pelo autor

C198c Campos, Marcos Vinicius Pereira Borges de.
Cultivo da microalga *Dunaliella salina* (BMAK 116)
em efluente de tanques de carcinicultura que
empregam o Sistema de Bioflocos BFT. / Marcos
Vinicius Pereira Borges de Campos; Orientador José
Juan Barrera-Alba. -- Santos, 2019.
54 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Engenharia Ambiental) --
Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo,
2019.

1. Fitoplâncton. 2. carotenoides. 3. BFT. 4.
fitoremediação. 5. bioflocos. I. Barrera-Alba, José
Juan, Orient. II. Título.

CDD 628

Bibliotecária Daianny Seoni de Oliveira - CRB 8/7469



“O extraordinário está no que fazemos,
não em quem somos”
(Lara Croft)

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por sempre iluminar meu caminho;

Aos meus pais, Ronilda e Adilson, e a meu irmão, Mateus, que, dentre suas limitações, sempre me cederam seu amor e apoio incondicional, por estarem sempre ao meu lado e por serem o meu maior alicerce na vida;

Ao Prof. Dr. José Juan Barrera-Alba, por ser um exemplo e por toda a orientação, atenção, confiança, amizade e estímulo para seguir até a conclusão deste trabalho;

A Thais de Oliveira Cornejo, não apenas pelo auxílio durante as análises e escrita dessa monografia, mas também por toda a parceria;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Schweitzer e aos técnicos Fabrini, Natacha, Rafael e demais membros do Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), por cederem o efluente necessário para desenvolvimento dos experimentos e pelo auxílio, estrutural e didático, durante as análises de nutrientes;

Ao Banco de Microrganismos Marinhos Aidar & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP), pela doação das cepas das amostras da microalga *Dunaliella salina* (BMAK 116) necessárias para o desenvolvimento dos experimentos;

A todos meus familiares, amigos e colegas que, diretamente ou indiretamente, contribuíram com a construção desse trabalho, seja por meio de críticas, sugestões, ideias, ou simplesmente por tornar essa jornada mais tranquila e reconfortante;

E por fim, mas não menos importante, à UNIFESP, seu corpo docente e demais membros, por terem me proporcionado nesses oito anos experiências memoráveis, possibilidades de chegar a lugares antes inimagináveis e oportunidades de alcançar conquistas que me moldaram e me levaram a onde estou e a ser quem sou hoje;

A esses e outros, minha eterna gratidão.

Sumário

Resumo	7
Introdução e Justificativa	9
Objetivos	14
Objetivos específicos	15
Materiais e Métodos	16
Caracterização do Efluente	16
Cultivo de Microalgas	16
Delineamento Experimental	17
Forma de Análise dos Resultados	19
Resultados e Discussão	23
Conclusão	44
Referências Bibliográficas	46

Resumo

O presente estudo buscou avaliar o desenvolvimento da espécie de microalga *Dunaliella salina* (BMAK 116) cultivada em efluente de tanques de carcinicultura que empregam o cultivo BFT cedido pelo Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O sistema de cultivo BFT – Biofloc Technology System - é uma técnica de cultivo de camarões em cativeiro superintensivo que ajuda a melhorar a qualidade da água e o aproveitamento de nutrientes presentes no sistema, além de apresentar outras qualidades. Foram considerados como indicadores tanto a eficiência do cultivo de biomassa algal, em parâmetros de crescimento da cultura e produção de pigmentos fotossintetizantes, quanto a eficiência da biorremediação na remoção de nutrientes nitrogenados inorgânicos, comparando as concentrações desses nutrientes no efluente pré e pós tratamento. Cepas de microalgas da espécie *D. salina* foram cedidas pelo Banco de Microorganismos Marinhos Aider & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP) e, inicialmente, testadas em um controle com meio Guillard F/2 e em tratamentos empregando diluições de 25% e 50% de efluente. *D. salina* apresenta um grande potencial biotecnológico nas áreas de cosméticos, fármacos, alimentação humana e, inclusive, na área da aquicultura, através da suplementação animal com rações ricas em pigmentos produzidos por microalgas dessa espécie. Os resultados para esse experimento inicial demonstraram que o controle apresentou a maior densidade celular máxima ($5,19 \times 10^9 \pm 21$) e maior proporção pigmentos por células do que os demais tratamentos, e, entre os meios de tratamento que empregaram efluente, o meio com 50% de diluição se mostrou mais propício para o crescimento algal e produção de pigmentos do que o meio com 25% de diluição. A partir disso, um novo experimento foi realizado testando as cepas de *D. salina* em um controle com meio Guillard F/2 e em tratamentos empregando a diluição de 50% de efluente integral e 50% de efluente enriquecido com vitaminas e metais traço.

Os resultados mostraram que o meio de tratamento com 50% de efluente enriquecido apresentou a maior densidade celular máxima ($5,37 \times 10^9 \pm 16$) e a maior proporção pigmentos por células dentre todos os tratamentos, demonstrando a eficiência do emprego de efluente BFT enriquecido com vitaminas e metais traço como meio de cultivo de *D. salina*. Os resultados da fitorremediação apontaram que os valores de nitrato sofreram redução em todos os tratamentos, porém os de nitrito e amônia aumentaram durante os experimentos, sendo que os valores de amônia finais em todos os tratamentos ultrapassaram os valores de segurança para cultivos de crustáceos aquícolas, impossibilitando o reaproveitamento da água pós-tratamento no sistema BFT; entretanto, ainda assim os valores de nutrientes nitrogenados inorgânicos de todos os tratamentos se encontraram abaixo dos valores máximos padrões para lançamento de efluentes previstos pela Resolução CONAMA 357/2005, alterada pela Resolução CONAMA 430/2011, possibilitando assim o lançamento do efluente pós-tratamento em corpos hídricos adequadamente.

Palavras chave: Fitoplâncton; carotenoides, BFT; fitorremediação; bioflocos.

Introdução e Justificativa

A aquicultura, ou cultivo de organismos aquáticos, é um dos setores que mais tem se expandido globalmente nas últimas décadas. Segundo relatórios da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), a contribuição da prática da aquicultura de diversos organismos para o estoque de suprimentos mundial cresceu de 3,9% para 32,4% de 1970 a 2004, apresentando uma taxa de crescimento de cerca de 8,8%, enquanto que a taxa de crescimento do setor pesqueiro foi de cerca de 1,2% e a do setor de pecuária de cerca de 2,8% (FAO, 2006; 2008). Estima-se que atualmente cerca de metade do consumo de peixe mundial é proveniente de cultivos, e a tendência prevista é que, conforme a demanda mundial por alimentos saudáveis continue a crescer, cresça também a produção por parte da aquicultura, tanto pela exaustão dos estoques pesqueiros e pela escassez de recursos aquáticos quanto pelo desenvolvimento de novas tecnologias e formas de gestão (BESOLD, 2015; TROELL *et al.*, 2014).

Dentre os diversos ramos da aquicultura, o da carcinicultura, ou cultivo de camarões, é um dos que tem recebido cada vez mais destaque e é o que mais cresceu no Brasil nas últimas décadas, apresentando um crescimento quase exponencial, em especial na região Nordeste (TAHIM, 2014). Dentre as principais formas de cultivo de camarões em cativeiro, uma das mais usadas é a tecnologia do Sistema de Bioflocos (BFT – Biofloc Technology System). De acordo com autores como Krummenauer *et al.* (2012) e Fóes *et al.* (2012), a técnica de cultivo superintensivo através do Sistema BFT ajuda a melhorar a qualidade da água, reduz a probabilidade de introdução de doenças no sistema e melhora o aproveitamento de nutrientes presentes no sistema por parte dos microrganismos que formam os bioflocos. Esses bioflocos são, basicamente, aglomerados de bactérias, ciliados, flagelados e outros microrganismos com partículas, polímeros orgânicos e células mortas, que atuam na transformação dos compostos nitrogenados dissolvidos na água como nitrito e amônia, que podem ser tóxicos quando em altas concentrações, mediante o aporte de carbono dissolvido por fontes externas (KRUMMENAUER *et al.*, 2012; FÓES *et al.*, 2012; AVNIMELECH, 2009).

Além das vantagens já citadas, os bioflocos formados podem ainda servir de alimentação para os camarões cultivados, o que possibilita o aumento da densidade da estocagem de camarões e, conseqüentemente, da produtividade do cultivo como um todo, por possibilitar um uso de menores áreas e uma redução na utilização de ração (CRAB *et al.*, 2012; SAMOCHA *et al.*, 2004). Porém, apesar dos pontos positivos apresentados pela técnica BFT, Tahim (2014) evidencia que um dos maiores desafios atuais, tanto da carcinicultura quanto da aquicultura como um todo, é conciliar sua expansão com a sustentabilidade técnica, ambiental e socioeconômica através da redução de possíveis impactos ambientais que os cultivos podem causar, visto que a produção de cultivos cada vez mais intensivos provoca interferências ambientais cada vez mais fortes (HOLANDA, 2017).

Um desses possíveis impactos se dá através da liberação de efluentes aquícolas ricos em nutrientes e matéria orgânica no momento onde ocorre a despesca dos organismos produzidos (HOLANDA, 2017; BESOLD, 2015), e com isso, uma possível alternativa para solucionar esse impacto está no tratamento desses efluentes, previamente seu lançamento em corpos hídricos, com o emprego de organismos que sejam capazes de absorver o excesso dessa matéria orgânica e, especialmente, desses nutrientes. Vale lembrar que os processos comuns de tratamento de efluentes resultam em um descarte aparentemente limpo que é descarregado em corpos d'água naturais, entretanto, quando há altas concentrações de matéria orgânica e de nutrientes inorgânicos no efluente descarregado, isso poderia impedir o seu reuso e acelerar a eutrofização desses corpos hídricos, além de mais problemas a longo prazo devido a possíveis orgânicos refratários e metais pesados também descarregados (KRUMMENAUER *et al.*, 2011; 2012; ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012; SCHNEIDER *et al.*, 2005). No Brasil, a Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (MMA, 2005), alterada pela Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011 (MMA, 2011), são as legislações responsáveis por classificar os corpos d'água e estabelecer padrões e condições para o lançamento de efluentes líquidos, além de definir outras diretrizes que tenham como objetivo limitar a carga poluidora descarregada em meio natural.

A Tabela 1, abaixo, mostra os valores padrões máximos de lançamento de efluentes líquidos em corpos hídricos para clorofila *a*, sólidos dissolvidos totais e alguns dos principais parâmetros inorgânicos, que são propostos pela Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005 (MMA, 2005), alterada pela Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011 (MMA, 2011).

Tabela 1. Padrões de lançamento de efluentes para clorofila *a*, sólidos dissolvidos totais e nutrientes inorgânicos propostos pelas Resoluções CONAMA 357/2005 (MMA, 2005) e CONAMA 430/2011 (MMA, 2011).

Parâmetro	Valor Máximo
Clorofila <i>a</i>	10 µg/L
Sólidos dissolvidos totais	500 mg/L
Alumínio dissolvido	0,1 mg/L Al
Bário total	5,0 mg/L Ba
Berílio total	0,04 mg/L Be
Cádmio total	0,2 mg/L Cd
Chumbo total	0,5 mg/L Pb
Cobalto total	0,05 mg/L Co
Cobre dissolvido	1,0 mg/L Cu
Cromo total	0,05 mg/L Cr
Cromo hexavalente	0,1 mg/L Cr+6
Cromo trivalente	1,0 mg/L Cr+3
Estanho total	4,0 mg/L Sn
Ferro dissolvido	15,0 mg/L Fe
Fósforo total (ambiente lântico)	0,020 mg/L P
Fósforo total (ambiente intermediário, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lântico)	0,025 mg/L P
Fósforo total (ambiente lótico e tributários de ambientes intermediários)	0,1 mg/L P
Lítio total	2,5 mg/L Li
Manganês total	1,0 mg/L Mn
Mercurio total	0,01 mg/L Hg
Níquel total	2,0 mg/L Ni
Nitrato	10,0 mg/L N
Nitrito	1,0 mg/L N
Nitrogênio amoniacal total	20,0 mg/L N
Prata total	0,1 mg/L Ag
Vanádio total	0,1 mg/L V
Zinco total	5,0 mg/L Zn

Dos organismos com habilidade natural de biorremediação, o uso de microalgas tem se destacado como um eficiente mecanismo de tratamento de efluentes, como demonstram os trabalhos de Besold (2015), Cai *et al.* (2013), Jiang *et al.* (2011) e Pittman *et al.* (2011), por exemplo. As microalgas são um grupo heterogêneo de microrganismos autotróficos unicelulares e fotossintetizantes que convertem energia solar em energia química armazenada na forma de polissacarídeos, lipídios, proteínas, hidrocarbonetos e outros, o que viabiliza sua obtenção e aplicação comercial como geração de matéria prima para diferentes setores, como o farmacêutico, o alimentício e o energético (FORMIGHIERI *et al.*, 2012; CARDOSO *et al.*, 2011; DERNER *et al.*, 2006; PATIL & ANIL, 2005). Além de sua composição, outras características que tornam as microalgas altamente interessantes e promissoras para possíveis aplicações biotecnológicas, como por exemplo para a produção de biocombustíveis, suplementos alimentares e produtos medicinais e nutricionais (TINOCO *et al.*, 2015), são seu rápido crescimento e desenvolvimento em um curto intervalo de tempo (FENG *et al.*, 2011), a alta adaptabilidade a ambientes de condições variadas (TORRES, 2014), e a eficiência no mecanismo de sequestro de dióxido de carbono atmosférico (WANG *et al.*, 2008), o que contribuiria ainda para a redução de gases poluentes na atmosfera.

Dentre as tecnologias aplicadas atualmente para o cultivo de microalgas para fins biotecnológicos, a principal é por meio de fotobioreatores abertos ou fechados (CARDOSO *et al.*, 2011), que necessitam de alimentação constante. Com isso, a principal limitação para a produção e cultivo em larga escala de microalgas em fotobioreatores atualmente ainda é o gasto para manter a oferta de nutrientes no sistema (CHISTI, 2007). Para contornar essa dificuldade, estudos acerca da elaboração de melhores meios de cultivo e de melhor geração de compostos metabólitos apontam que esses fotobioreatores podem ser alimentados com água de efluentes domiciliares, industriais, agrícolas e residuários de sistemas de aquicultura, desde que sejam ricas em metais traço, vitaminas e nutrientes como os nitrogenados e o fosfato, elementos essenciais para o crescimento celular algal (BESOLD, 2015; PITTMAN *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2010).

Estudos como o de Holanda (2017), Abreu *et al.* (2016) e Besold (2015) se propuseram a avaliar taxas de produção celular de diferentes espécies de microalgas em efluentes provenientes de tanques de carcinicultura, para dessa forma avaliar se tal tipo de efluente pode ser utilizado como meio de cultivo em fotobioreatores para otimizar a produção de biomassa e reduzir custos. Vale citar que no ramo da aquicultura várias espécies diferentes de microalgas já vem sendo alvo de interesse econômico e comercial, como espécies do gênero *Nannochloropsis* (BESOLD, 2015; RENAULD *et al.*, 1991) para fins de extração de lipídios, do gênero *Chaetoceros* (HOLANDA, 2017) para fins de extração de lipídios e ácidos graxos poli-insaturados, dos gêneros *Arthrospira* e *Spirulina* (BESOLD, 2015; TINOCO *et al.*, 2015) para produção de vitaminas e proteínas, e dos gêneros *Haematococcus* e *Dunaliella* (BESOLD, 2015; TINOCO *et al.*, 2015) para produção de pigmentos. A produção de pigmentos é de interesse do setor aquícola pois espécies alvo de cultivos, como a truta, o salmão, a lagosta e o próprio camarão, apresentam uma carne mais alaranjada e avermelhada devido à presença de pigmentos do tipo carotenoides (MESQUITA *et al.*, 2017), e assim, é possível intensificar a coloração da carne pela adição de pigmentos na cadeia alimentar da espécie cultivada, seja por meio de ração ou por suplementos na dieta (MESQUITA *et al.*, 2017; SHAHIDI & BROWN, 1998).

O gênero de microalgas *Dunaliella* pertence à Divisão Chlorophyta (algas verdes) e é formado por espécies eucarióticas fotossintetizantes de tamanho de célula entre 9 – 11 μm (DA FRÉ, 2016) e que são capazes de sobreviver em amplas faixas de concentração salina e de temperatura (TINOCO *et al.*, 2015; BEN-AMOTZ *et al.*, 2009). Por não apresentarem parede celular rígida, o formato da célula depende da salinidade do meio onde se encontra (TINOCO *et al.*, 2015), sendo que sua sobrevivência a choques hiperosmóticos resulta da produção de glicerol e pigmentos pelas células para regular a osmorregulação, tornando-se possível dizer que a quantidade de glicerol intracelular e de pigmentos produzidos por essa microalga responde proporcionalmente à salinidade ambiental e isso confere a ela um alto grau de adaptação ambiental (DA FRÉ, 2016; TINOCO *et al.*, 2015; BEN-AMOTZ *et al.*, 2009).

As principais espécies desse gênero são aquelas com maior capacidade de produzir e acumular pigmentos, em especial carotenoides como α -caroteno, β -caroteno, violaxantina e luteína (TAFRESHI & SHARIATI, 2009), tanto de forma natural quanto em condições de estresse (EINALI *et al.*, 2017). Dentre as diferentes espécies de *Dunaliella* reportadas, uma que se destaca é a espécie *Dunaliella salina* como principal fonte comercial do carotenoide β -caroteno natural no mundo (TAFRESHI & SHARIATI, 2006; EINALI *et al.*, 2017). A partir disso, diversos estudos têm se proposto a investigar alternativas técnicas mais baratas e viáveis de cultivo dessa espécie, como por exemplo o estudo de Alshareef & Sayegh (2016), que avaliou a eficiência de cultivo de *D. salina* em efluentes de estações de esgoto e de dessalinização. Nesse estudo, o meio de tratamento formado por água marinha e efluente esterilizado de estação de dessalinização, em proporção 2:1, atingiu as taxas máximas de produção de β -caroteno devido à alta salinidade do meio, enquanto que o meio de tratamento formado completamente por água marinha atingiu as taxas máximas de crescimento celular e de densidade algal (ALSHAREEF & SAYEGH, 2016).

Objetivos

Avaliar a viabilidade e eficiência do cultivo da espécie de microalga *Dunaliella salina* (BMAK 116) em águas residuais provenientes de tanques de carcinicultura que empregam o sistema de cultivo BFT, em concordância com a fitoremediação do efluente selecionado.

Objetivos específicos

- Caracterizar o efluente proveniente de tanques de carcinicultura que utilizem cultivo através do Sistema de Bioflocos;
- Demonstrar a eficiência do cultivo de biomassa da espécie *D. salina* no meio selecionado, em parâmetros de taxa de crescimento da cultura e produção de pigmentos fotossintetizantes;
- Demonstrar a eficiência da biorremediação por parte da espécie selecionada na remoção de elementos nitrogenados inorgânicos durante o tratamento do efluente selecionado, caracterizando o efluente após tratamento e avaliando seu possível reaproveitamento no sistema de cultivo aquícola e/ou seu descarte em corpos hídricos segundo os parâmetros das resoluções CONAMA 357/2005 (MMA, 2005) e CONAMA 430/2011 (MMA, 2011).

Materiais e Métodos

Caracterização do Efluente

O efluente foi coletado de tanques de carcinicultura que empregam o cultivo através do sistema BFT do Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal de São Paulo, campus Baixada Santista, coordenado pelo Prof. Dr. Rodrigo Schweitzer. Para caracterizar o efluente, foram adotados como parâmetros as concentrações de amônia, nitrato e nitrito dissolvido.

A concentração de amônia foi realizada pelo método de Koroleff (1969), descrito em Grasshoff *et al.* (1983), o qual emprega Nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) e Fenol + álcool ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) como reagentes e Citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) como solução oxidante. O nitrito dissolvido foi avaliado segundo a metodologia de Bendschneider & Robinson (1952), descrito em Baumgarten *et al.* (1996), a qual emprega solução de N – (1- naftil) etilenodiamono e solução Diazotante ($\text{NH}_2\text{-SO}_2\text{O}_6\text{H}_4\text{NH}_2$) como reagentes. Por fim, para a avaliação de nitrato foi empregada a metodologia proposta por Grasshoff *et al.* (1983), que consiste em um processo de redução do nitrato a nitrito através de uma coluna redutora de amálgama de cádmio (grãos de cádmio tratados com solução cúprica). Todas as análises de nutrientes inorgânicos foram realizadas no Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal de São Paulo, campus Baixada Santista, com a supervisão de técnicos laboratoriais.

Cultivo de Microalgas

Os experimentos foram realizados com cepas de *D. salina* (BMAK 116) cedidas pelo Banco de Microorganismos Marinhos Aida & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP). As cepas isoladas foram mantidas numa câmara de cultivo com meio F/2 (GUILLARD & RYTHER, 1962), com a temperatura de 20°C, salinidade de 35 e fotoperíodo 14 horas luz:10 horas escuridão (14:10). Inicialmente as microalgas foram submetidas a uma fase de aclimação de 15 dias para atingir fase exponencial de crescimento até alcançar uma densidade inicial de $\sim 10^6$ céls/mL, para que posteriormente fossem desenvolvidos os experimentos.

O meio de cultivo de Guillard F/2 foi adotado como controle nos experimentos por este ser o meio de cultivo mais adequado para espécies do gênero *Dunaliella* em comparação com outros meios de cultivo, justamente por proporcionar vitaminas, metais traços e nutrientes em quantidades necessárias para o crescimento celular, como mostrou o trabalho de Neto *et al.* (2012).

Delineamento Experimental

Experimento 1

No primeiro experimento, que tinha por objetivo avaliar o efeito das diferentes concentrações de efluente no desenvolvimento da cultura e as melhores condições de cultivo, alíquotas das culturas de cepas aclimatadas foram submetidas a diferentes concentrações do efluente em frascos de 500mL por 18 dias. Os frascos foram preenchidos com 200mL de três meios de tratamento diferentes, sendo as concentrações selecionadas de 25% (150mL de água marinha e 50mL de efluente) e 50% (100mL de água marinha e 100mL de efluente), em comparação com um meio controle F/2 (GUILLARD & RYTHIER, 1962), como mostra a Figura 1. O inóculo inicial de *D. salina* nos tratamentos foi de $1,56 \times 10^4$ céls/mL, e o acompanhamento diário de crescimento da cultura foi realizado através da coleta de alíquotas de 5mL para posterior contagem de células em laboratório.

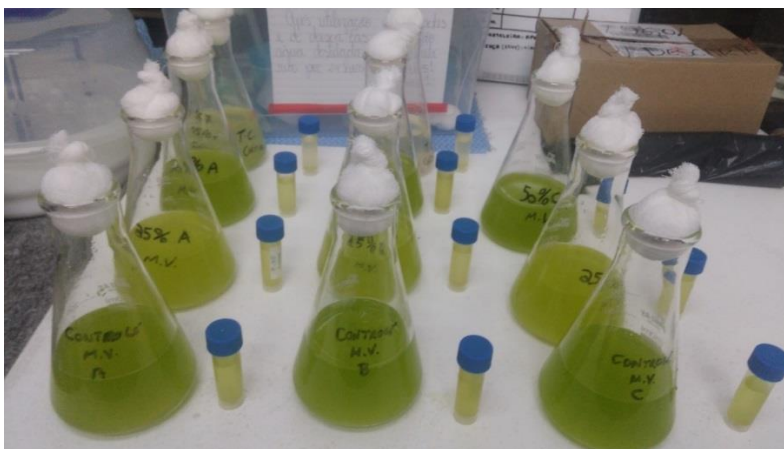


Figura 1. Frascos de tratamento com diferentes meios para avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de efluente no desenvolvimento da cultura de *D. salina*. Fonte: Autoria própria.

Esse experimento teve três tipos de tratamento diferentes: controle F/2, tratamento com 25% de efluente BFT e tratamento com 50% de efluente BFT. Todos os meios de tratamento foram realizados em triplicata e mantidos durante todo o experimento em uma câmara de cultivo com a temperatura de 20°C, salinidade de 35 e fotoperíodo 14 horas luz:10 horas escuridão (14:10), como mostra a Figura 2.



Figura 2. Câmara de cultivo de microalgas do Laboratório de Biotecnologia Marinha da Universidade Federal de São Paulo, campus Baixada Santista. Fonte: Autoria própria.

Experimento 2

Após o término do primeiro experimento e a verificação da influência das diferentes concentrações do efluente no crescimento celular, foram geradas novas alíquotas das culturas de cepas, as quais foram submetidas à mesma concentração de 50% de efluente, porém em condições diferentes.

Para isso, frascos de 500mL foram preenchidos com 200mL de três meios de tratamento diferentes, sendo a concentração selecionada de 50% (100mL de água marinha e 100mL de efluente) pois esta foi a concentração que representou condições mais propícias para o crescimento celular no experimento anterior, porém, foram elaborados dois meios de tratamento distintos, um com a adição do efluente integral e outro com a adição do efluente enriquecido com 200mL de solução fertilizante de vitaminas e metais. O inóculo inicial de *D. salina* nos tratamentos foi de $2,36 \times 10^4$ céls/mL, e o acompanhamento diário de crescimento da cultura foi realizado através da coleta de alíquotas de 5mL para posterior contagem de células em laboratório. O experimento 2 teve como duração total 19 dias.

Esse experimento teve três tipos de tratamento diferentes: controle F/2, tratamento com 50% de efluente BFT integral e tratamento com 50% de efluente BFT enriquecido com solução de vitaminas e metais. Todos os meios de tratamento foram realizados em triplicata e mantidos durante todo o experimento em uma câmara de cultivo com a temperatura de 20°C, salinidade de 35 e fotoperíodo 14 horas luz:10 horas escuridão (14:10).

Forma de Análise dos Resultados

A contagem de células em laboratório para determinação da densidade e crescimento celular foi realizada através de câmara de Neubauer em microscópio binocular modelo ZEISS no Laboratório de Biotecnologia Marinha do Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo (Figura 3). A contagem das amostras foi realizada de forma a considerar os quatro quadrantes da câmara, obtendo o número de células/mL através da fórmula:

$$\text{nº de células por mL} = (\text{nº total de células}) / (\text{nº de quadrantes contados}) \times 10.000$$

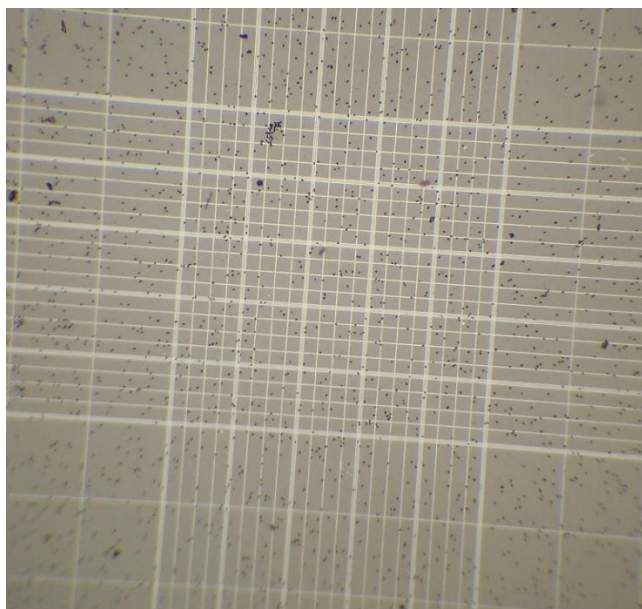


Figura 3. Contagem de células de *D. salina* utilizando câmara de Neubauer. Fonte: Autoria própria.

Os resultados permitiram a obtenção das taxas de crescimento específica (μ) (LOURENÇO, 2006) e das curvas de crescimento das cepas selecionadas sob as diferentes condições às que foram submetidas. As taxas de crescimento (μ /dia) e o tempo de duplicação celular (G/dia) para a fase exponencial de cada cepa e réplica foram calculadas segundo as fórmulas apresentadas por Fogg & Thake (1987):

$$\mu = (\ln (N) - \ln (N_0)) / (t - t_0)$$

$$G = \ln (2) / \mu$$

Onde:

μ é a velocidade específica de crescimento;

G é o tempo de duplicação celular, calculado a partir de μ ;

N_0 é o número inicial de células em m/L no tempo inicial t_0 ;

N é o número final de células em m/L no tempo t.

As amostras foram então submetidas a análises estatísticas considerando parâmetros de normalidade de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade de Levene, além de um Teste T de Student, com o auxílio do software Bioestat 5.0 (AYRES *et al.*, 2005).

No último dia de cada experimento, alíquotas de 50mL de cada uma das amostras foram filtradas em filtro de filtros de fibra de vidro de 0,7 µm para separação da fase sólida (biomassa algal) da fase líquida (efluente aquoso). As amostras das fases sólidas filtradas (Figura 4) foram imediatamente congeladas e preservadas a -20°C até a análise de concentração de pigmentos fotossintetizantes. Para análise, os filtros foram colocados em acetona (90%), macerados e deixados para extrair no escuro a 4°C por 24 horas. Após esse período o espectro de absorção entre 400 e 750 nm dos extratos foi analisado num espectrofotômetro e a concentração dos pigmentos fotossintetizantes foi calculada de acordo com as equações descritas em Lorenzen (1967), Jeffrey & Humphrey (1975) e Parsons *et al.* (1984):

$$Cl\ a\ (mg/m^3) = [11,85 * A\ (664) - 1,54 * A\ (647) - 0,08 * A\ (630)] * (V_a/V_f)$$

$$Cl\ b\ (mg/m^3) = [21,03 * A\ (647) - 5,43 * A\ (664) - 2,66 * A\ (630)] * (V_a/V_f)$$

$$Carotenóides\ (mg/m^3) = [7,6 * A\ (480) - 1,49 * A\ (510)] * (V_a/V_f)$$

Onde:

A() = absorvância no respectivo comprimento de onda;

V_a = volume da acetona;

V_f = volume filtrado da amostra.



Figura 4. Biomassa algal de *D. salina* filtrada através de filtros de fibra de vidro de 0,7 μ m para análise de pigmentos em espectrofotômetro. Fonte: Autoria própria.

As amostras das fases líquidas do efluente aquoso coletadas foram também estocadas em repouso em tubos de Falcon (Figura 5) e congeladas para serem analisadas segundo as metodologias descritas acima em “Caracterização do Efluente”.

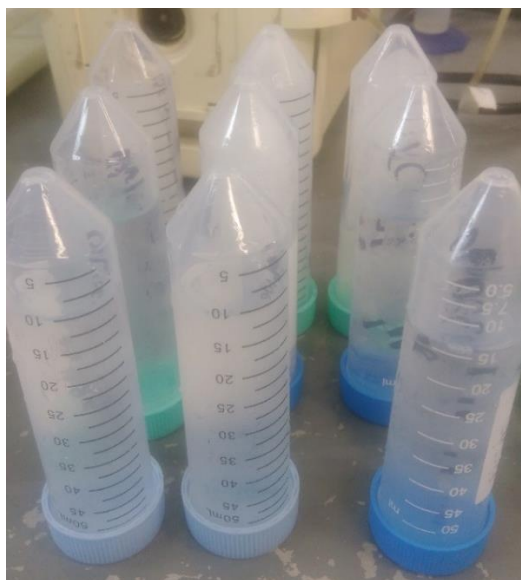


Figura 5. Amostras líquidas filtrada através de filtros de fibra de vidro de 0,7 μ m para análise de nutrientes inorgânicos. Fonte: Autoria própria.

Resultados e Discussão

Durante o primeiro experimento os valores de inóculo iniciais foram de $1,56 \times 10^4$ céls/mL para o controle e os tratamentos. As densidades celulares máximas foram registradas no último dia de análise, sendo de $5,19 \times 10^6$ céls/mL para o controle F/2 (C F/2), $4,21 \times 10^6$ céls/mL para o tratamento com diluição de 25% (T 25%) de efluente e $4,51 \times 10^6$ céls/mL para o tratamento com diluição de 50% (T 50%) (Figura 6).

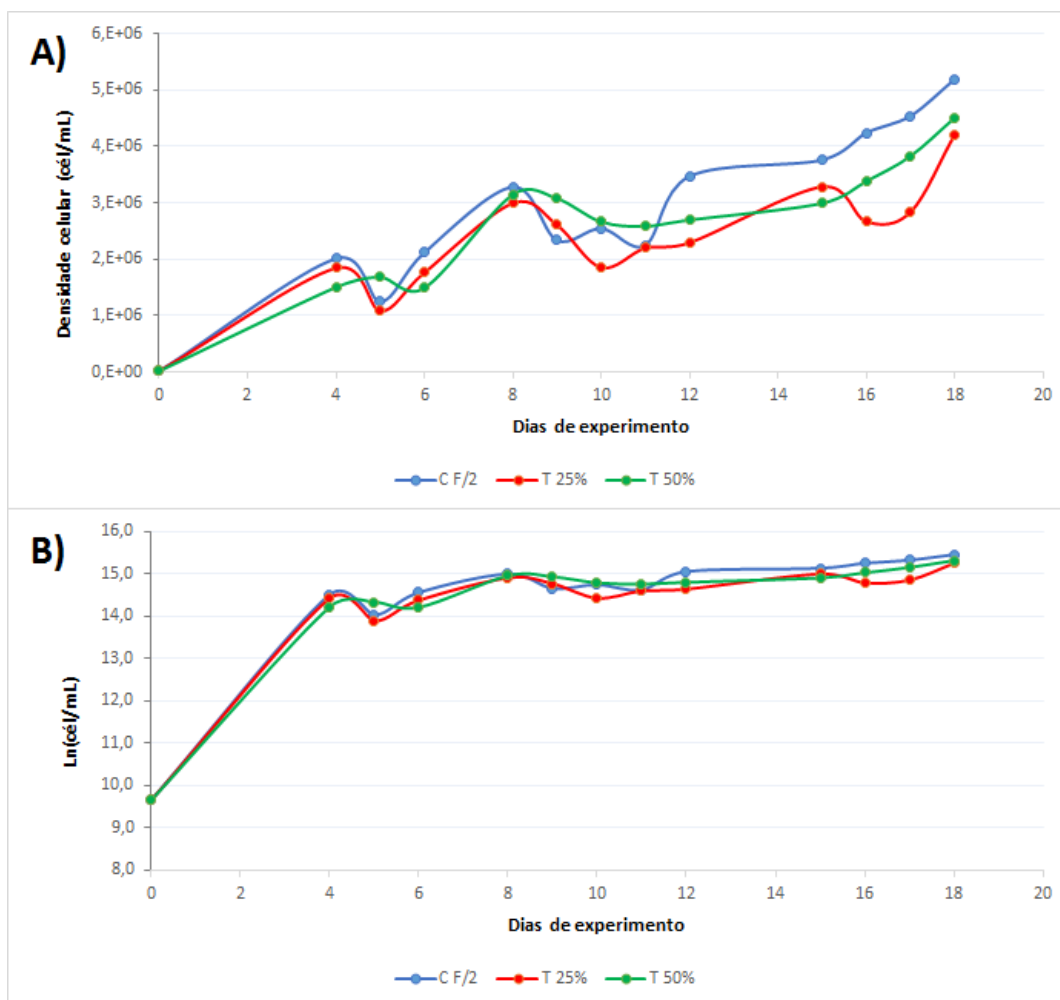


Figura 6. A) Abundância celular (cél/mL), e; B) abundância celular em base logarítmica natural (cél/mL) ao longo do tempo, em dias, no experimento 1, para o controle e os tratamentos. Valores representam as médias das réplicas de cada tratamento. Fonte: Autoria própria.

Apesar do controle C F/2 apresentar a maior densidade celular ao longo do período experimental, o meio T 25% apresentou uma taxa de crescimento exponencial um pouco maior (Figuras 7 e 8). Comparativamente, C F/2 apresentou uma taxa de crescimento da fase exponencial de $0,31 \text{ dia}^{-1}$ com taxa máxima de crescimento diário de $0,53 \text{ dia}^{-1}$ obtida no 6º dia de experimento, T 25% apresentou uma taxa de crescimento da fase exponencial de $0,33 \text{ dia}^{-1}$ com taxa máxima de crescimento diário de $0,49 \text{ dia}^{-1}$ obtida também no 6º dia de experimento, e T 50% apresentou uma taxa de crescimento da fase exponencial de $0,19 \text{ dia}^{-1}$ e taxa de crescimento máxima diária de $0,37 \text{ dia}^{-1}$ obtida no 8º dia de experimento (Figura 7 e Tabela 2). C F/2 também apresentou o menor tempo de duplicação celular, sendo este equivalente a $1,30 \text{ dia}^{-1}$, enquanto que os de T 25% e T 50% foram, respectivamente, $1,41 \text{ dia}^{-1}$ e $1,85 \text{ dia}^{-1}$, como pode ser visto na Tabela 2. Isto significa que o controle C F/2 necessitou de um menor número de dias para que o cultivo duplicasse o número total de células, dado que complementa o fato de o crescimento celular ter sido rápido e elevado nesse meio.

Tabela 2. Média dos valores densidade celular máxima (cél/L), taxas de crescimento celular diária máxima (μ ; dia^{-1}), tempo de duplicação celular (G; dia^{-1}) tempo em que foi obtida a taxa de crescimento diária máxima (em dias) e taxa de crescimento da fase exponencial do experimento (μ exponencial) obtidas no experimento 1, para o controle e os tratamentos.

	Densidade celular máx. (cél/L)	μ máxima (μ ; dia^{-1})	G máxima (G; dia^{-1})	Tempo (dias)	μ exponencial
C F/2	$5,19 \times 10^9 \pm 21$	0,53	1,30	6º dia	0,31
T 25%	$4,21 \times 10^9 \pm 24$	0,49	1,41	6º dia	0,33
T 50%	$4,51 \times 10^9 \pm 26$	0,37	1,85	8º dia	0,19

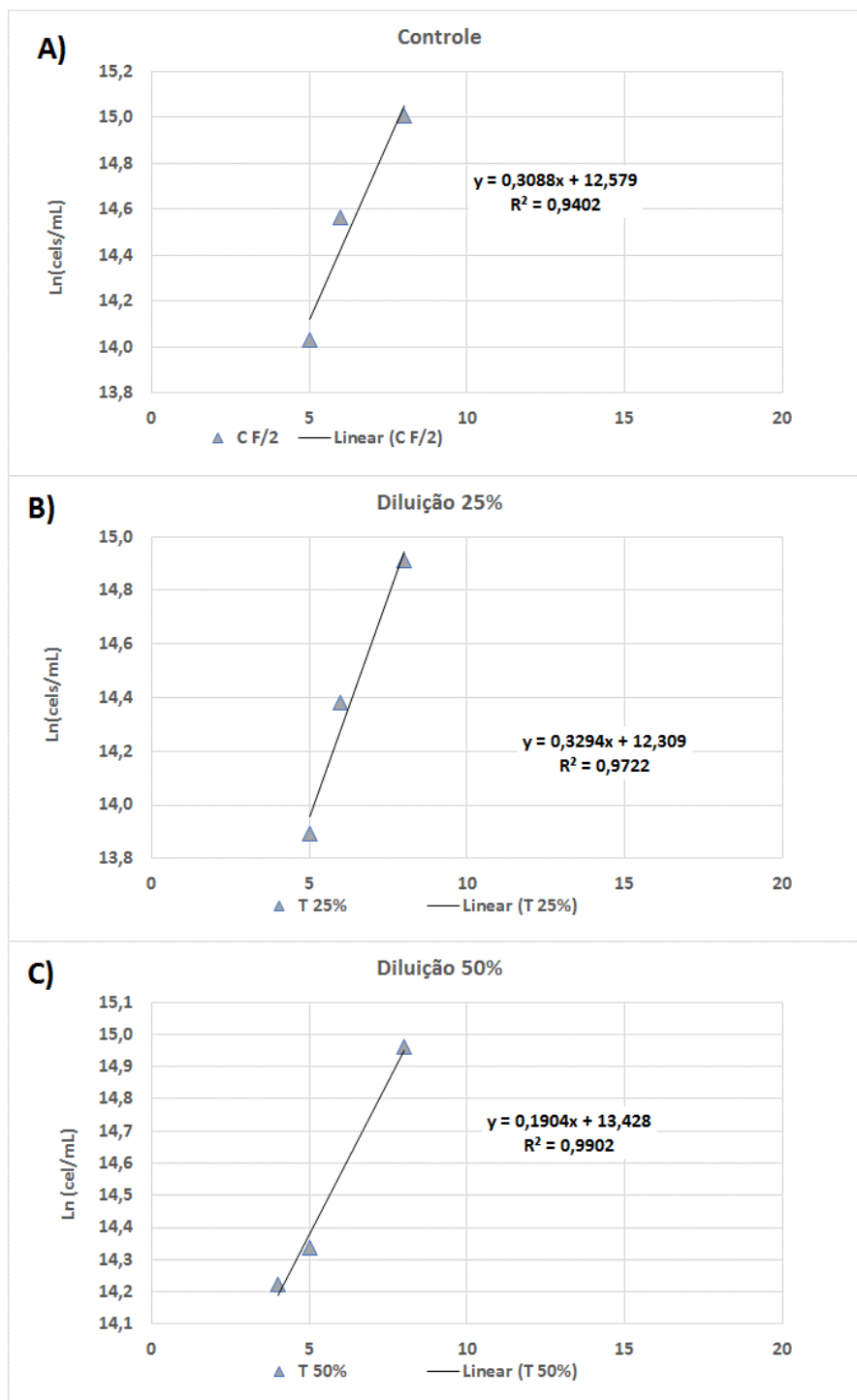


Figura 7. Taxas de crescimento celular (μ) na fase exponencial, em dias, no experimento 1, para A) controle C F/2; B) T 25%; C) T 50%. Valores calculados segundo a metodologia de Fogg & Thake (1987). Fonte: Autoria própria.

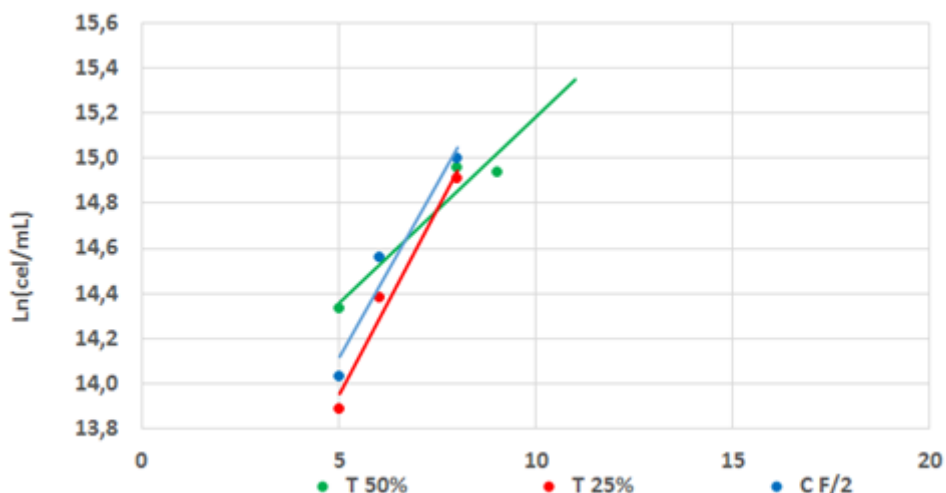


Figura 8. Taxas de crescimento celular (μ) ao longo do tempo, em dias, no experimento 1 para o controle e os tratamentos. Valores calculados segundo a metodologia de Fogg & Thake (1987). Fonte: Autoria própria.

Por meio das análises, foi possível também observar que o controle C F/2 e o tratamento T 25% permaneceram em fase de latência (fase lag) até o 5º dia de experimento e, a partir deste dia, iniciou-se a fase exponencial de crescimento da cultura até o 8º dia, quando entrou em uma fase estacionária de crescimento. Diferentemente, o tratamento T 50% permaneceu na fase lag até o 4º dia de experimento, dando início à fase exponencial de crescimento apenas a partir deste dia com fim no 8º dia, quando se iniciou a fase estacionária. Para o meio controle e ambos os tratamentos, após o fim da fase estacionária se iniciou uma segunda fase exponencial de crescimento entre os 15º e 19º dias de experimento, mas com taxas de crescimento relativamente menores do que as da primeira fase exponencial. Isso indica que no tratamento T 50% as células começaram a crescer exponencialmente um dia antes do que no tratamento T 25% e no controle C F/2, porém durante a fase exponencial esse crescimento foi menor e mais lento, apresentando menor taxa de crescimento e maior taxa de duplicação celular do que nos demais meios (Tabela 2).

Para a realização da análise de pigmentos foram analisadas as concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e os carotenoides, visto que o gênero *Dunaliella* pertence à Divisão Chlorophyta e estes são os principais pigmentos produzidos por clorófitas em geral. Os resultados apontaram que a biomassa algal de C F/2 apresentou no final do experimento, em média, 0,92 mg/L do pigmento clorofila *a*, 0,26 mg/L de clorofila *b* e 1,04 mg/L de carotenoides, enquanto que os tratamentos T 25% e T 50% apresentaram em média, respectivamente, 1,40 mg/L e 3,24 mg/L de clorofila *a*, 0,29 mg/L e 0,67 mg/L de clorofila *b* e 1,44 mg/L e 3,09 mg/L de carotenoides, como apresentado na Tabela 3. Esses resultados sugerem que, apesar de não apresentar uma densidade celular maior que o controle, os tratamentos onde houve diluição do efluente apresentaram maiores concentrações de pigmentos e, conseqüentemente, uma proporção de pigmento/célula maior, em especial T 50%, que apresentou o maior valor de pigmentos por célula (Tabela 4 e Figura 9).

Tabela 3. Média dos valores de pigmentos (Clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, em mg/L) e de densidade celular final (em cél/L) obtidas no experimento 1, para o controle e os tratamentos.

	Densidade celular final (cél/L)	Clorofila <i>a</i> (mg/L)	Clorofila <i>b</i> (mg/L)	Carotenóides (mg/L)
C F/2	5,19 x 10 ⁹ ± 21	0,92	0,26	1,04
T 25%	4,21 x 10 ⁹ ± 24	1,40	0,29	1,44
T 50%	4,51 x 10 ⁹ ± 26	3,24	0,67	3,09

Tabela 4. Médias das proporções de pigmentos por célula, considerando clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides (em pg/cél), obtidas no experimento 1, para o controle e os tratamentos.

	Clorofila <i>a</i> /cél (pg/cél)	Clorofila <i>b</i> /cél (pg/cél)	Carotenóides/cél (pg/cél)
C F/2	0,18	0,05	0,20
T 25%	0,33	0,07	0,34
T 50%	0,72	0,15	0,69

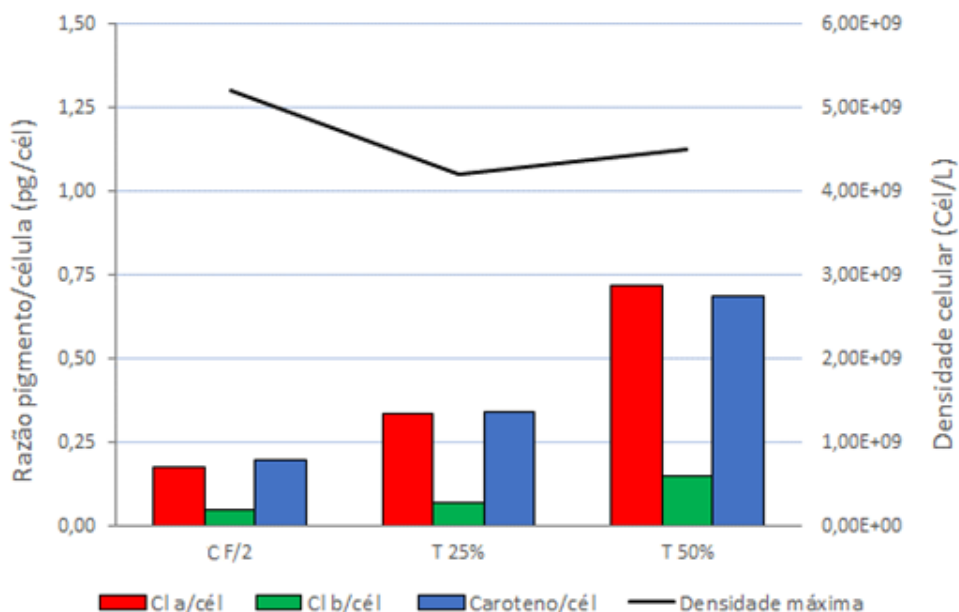


Figura 9. Densidade celular final (em células/L) e proporções de pigmentos por célula, considerando clorofila a, clorofila b e carotenoides, obtidas no experimento 1, para o controle e os tratamentos.
Fonte: Autoria própria.

Análises estatísticas realizadas apontaram que o controle C F/2 ($w=0.95$, $p=0.64$) e os tratamentos T 25% ($w=0.97$, $p=0.87$) e T 50% ($w=0.93$, $p=0.39$) seguem uma distribuição normal e são comparáveis. Assim, a Figura 10 apresenta uma análise através de gráfico boxplot onde é possível observar que C F/2 apresentou uma amplitude maior do que os demais tratamentos, e que a amplitude de T 50% foi maior do que a de T 25%, sendo que uma amplitude de gráfico maior representa uma variação de dados maior no mesmo tratamento e se relacionando com as densidades celulares máximas terem sido maiores, respectivamente, em C F/2, T 50% e T 25%. Na Figura 10 também é possível notar que C F/2 e T 50% apresentaram assimetrias em suas medianas, considerando a distribuição de dados, sendo a assimetria de C F/2 mais negativa e a de T 50% mais positiva. Apesar de C F/2 apresentar uma maior taxa de crescimento e uma menor taxa de duplicação celular em um mesmo período de tempo do que T 50%, este se mostrou como um tratamento relativamente mais propício para maiores produções de pigmentos fotossintetizantes do que C F/2 e T 25%.

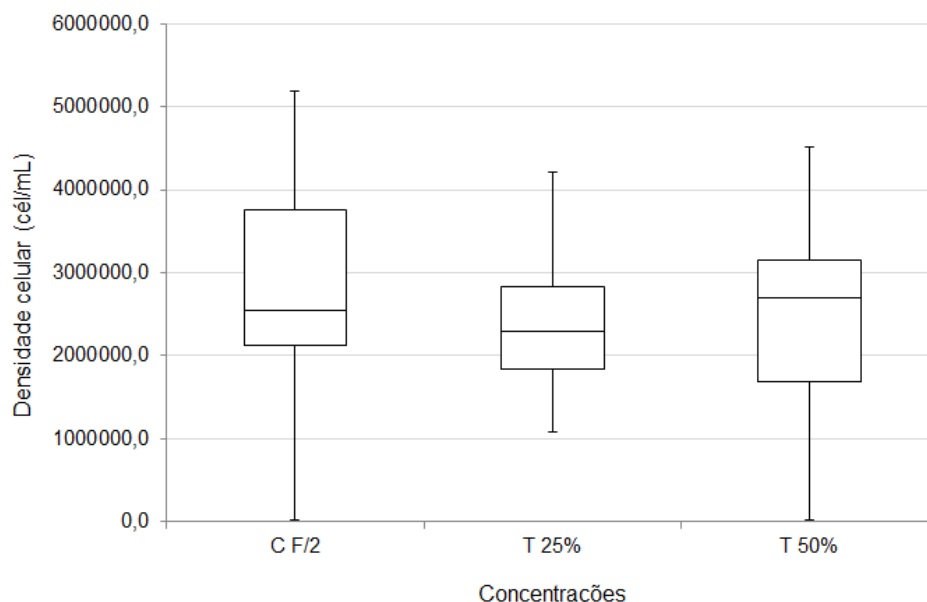


Figura 10. Boxplot da variação de densidade celular, obtidas no experimento 1, para o controle e os tratamentos. Fonte: Autoria própria.

Considerando que o meio controle apresentou a maior densidade celular mas o tratamento T 50% apresentou as maiores razões de pigmentos por célula, em especial de carotenoides, foi realizado um segundo experimento considerando tratamentos com diluição de 50% de efluente objetivando principalmente estudar uma maior concentração de pigmento por célula, como visto na Seção “Materiais e Métodos”.

Em outros estudos que investigaram a influência do efluente BFT no crescimento de microalgas, como o de Holanda (2017), que empregou o cultivo da espécie *Chaetoceros muelleri* nesse efluente, foi observado que o meio controle F/2 apresentou a densidade celular máxima de $1,54 \times 10^6$ céls/mL em um menor período quando em comparação com culturas onde o efluente foi diluído em 50% e onde o efluente foi empregado integralmente (100% de efluente); entretanto, apesar de uma notável variação na densidade celular durante o período de experimento, foi observado pelo autor que o tratamento com 50% de efluente BFT alcançou os maiores valores de taxa de crescimento de *C. muelleri*, sendo este de $0,58 \pm 0,31$ dia⁻¹.

Magnotti *et al.* (2016), por sua vez, avaliaram a taxa de remoção de nutrientes e a produção de biomassa das espécies *Tretaselmis chuii*, *Nannochloropsis oculata* e *Chaetoceros muelleri* cultivadas em efluentes BFT e seus resultados apontaram que tratamentos com 50% de diluição de efluente apresentaram taxas de biomassa seca relativa das três espécies muito próximas de seu controle F/2 e do tratamento com 100% de efluente integral - a saber, 592 mg/L, 480 mg/L e 165 mg/L para F/2, 545 mg/L, 457 mg/L e 73 mg/L para 50% de efluente, e 591 mg/L, 485 mg/L e 59 mg/L para 100% de efluente, respectivamente para as espécies *T. chuii*, *N. oculata* e *C. muelleri*. Ambos os estudos comprovam a eficiência do tratamento T 50% no cultivo de microalgas, motivando o delineamento de uma nova etapa de experimentos utilizando tal diluição.

Durante esse segundo experimento os valores de inóculo iniciais foram de $2,36 \times 10^4$ céls/mL para o controle e os tratamentos. As densidades celulares máximas para o controle e os tratamentos foi registrada no último dia de análise, sendo de $4,87 \times 10^6$ céls/mL para o controle F/2 (C F/2), $4,08 \times 10^6$ céls/mL para a diluição de 50% (T 50%) de efluente e $5,37 \times 10^6$ céls/mL para a diluição de 50% enriquecido (T 50% ENR) (Figura 11).

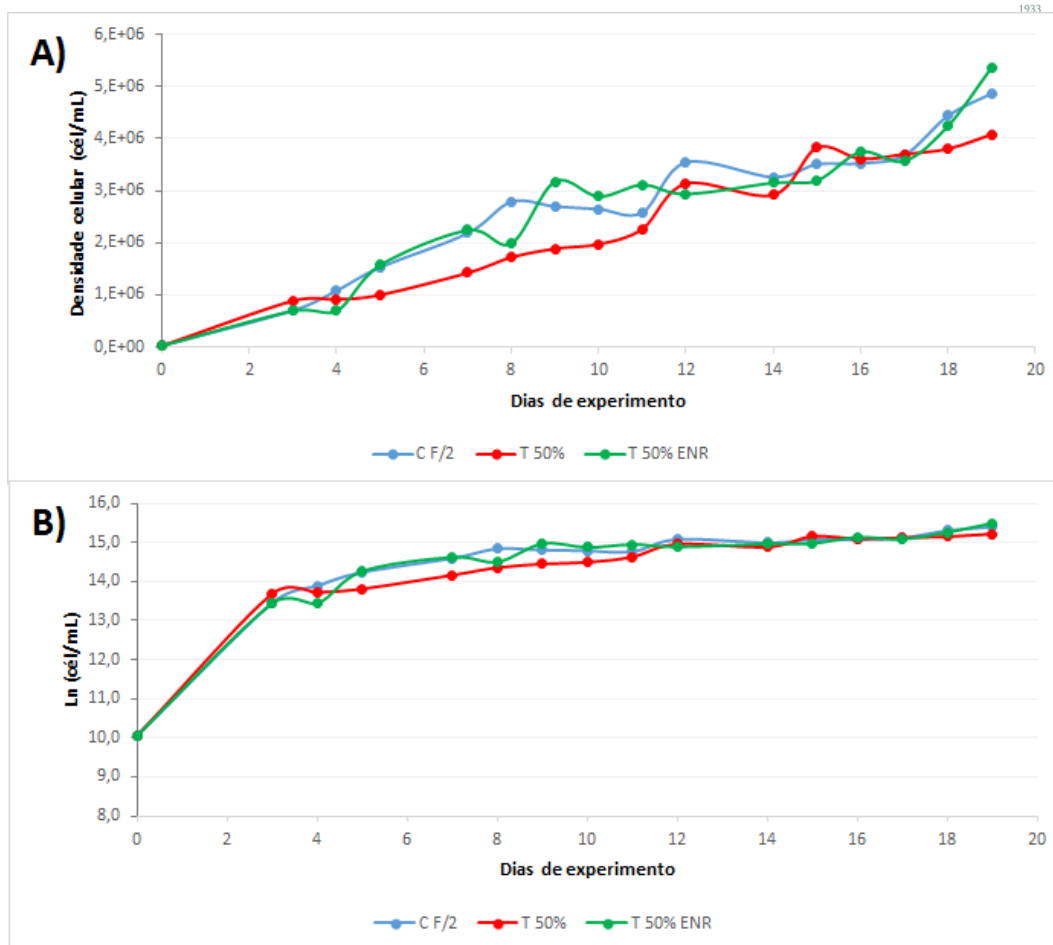


Figura 11. A) Abundância celular (cél/mL), e; B) abundância celular em base logarítmica natural (cél/mL) longo do tempo, em dias, no experimento 2 para o controle e os tratamentos. Valores representam as médias das tréplicas de cada tratamento. Fonte: Autoria própria.

Diferente do experimento 1, que foi marcado por maiores valores de taxa de crescimento no meio T 25%, o que ocorreu no experimento 2 foi uma maior taxa de crescimento em C F/2 (Figuras 12 e 13). Comparativamente, C F/2 (controle) apresentou uma taxa de crescimento da fase exponencial de $0,26 \text{ dia}^{-1}$ com taxa máxima de crescimento diário de $0,44 \text{ dia}^{-1}$ obtida no 4º dia de experimento, T 50% apresentou uma taxa de crescimento da fase exponencial de $0,13 \text{ dia}^{-1}$ com taxa máxima de crescimento diário de $0,33 \text{ dia}^{-1}$ obtida no 12º dia de experimento, e T 50% ENR apresentou uma taxa de crescimento da fase exponencial de $0,25 \text{ dia}^{-1}$ e taxa de crescimento máxima diária de $0,82 \text{ dia}^{-1}$ obtida no 5º dia de experimento (Figura 12 e Tabela 5).

Silva (2013), em um estudo onde se propôs a avaliar o cultivo de *Chlorella vulgaris* em efluentes aquícolas, observou que cultivos em meio Guillard F/2 não apresentaram fase de indução possivelmente por este ser um meio de cultivo com uma disponibilidade de nutrientes e metais traços satisfatória para o crescimento algal, dando início à fase exponencial de crescimento mais brevemente. Por meio das análises, foi possível também observar que tanto C F/2 quanto o tratamento T 50% ENR permaneceram em fase lag até o 3º dia de experimento e, a partir deste dia, iniciou-se a fase exponencial de crescimento das culturas, mostrando um mesmo padrão que se repetiu entre os tratamentos, enquanto que o tratamento T 50% deu início a sua fase exponencial apenas no 7º dia de experimento, permanecendo em fase lag até esse momento, o que levantou a possibilidade de que o efluente diluído em 50% não apresenta nutrientes e metais traços em disponibilidade necessária para acelerar o crescimento celular e, a partir do enriquecimento do efluente, foi possível obter uma maior taxa de crescimento celular.

Além disso, T 50% ENR apresentou o menor tempo de duplicação celular, sendo este equivalente a $0,85 \text{ dia}^{-1}$, enquanto que os de C F/2 e T 50% foram, respectivamente, $1,58 \text{ dia}^{-1}$ e $2,10 \text{ dia}^{-1}$, como pode ser visto na Tabela 5. Isto significa que o meio T 50% ENR necessitou de um menor número de dias para que o cultivo duplicasse o número total de células, dado que complementa o fato de que a densidade celular ter sido mais elevada nesse meio de tratamento.

Tabela 5. Média dos valores densidade celular máxima (cél/L), taxas de crescimento celular diária máxima (μ ; dia^{-1}), tempo de duplicação celular (G; dia^{-1}) tempo em que foi obtida a taxa de crescimento diária máxima (em dias) e taxa de crescimento da fase exponencial do experimento (μ período) obtidas no experimento 2, para o controle e os tratamentos.

	Densidade celular máx (cél/L)	μ máxima	G máxima (G; dia^{-1})	Tempo (dias)	μ fase exponencial
C F/2	$4,87 \times 10^9 \pm 23$	0,44	1,58	4º dia	0,26
T 50%	$4,08 \times 10^9 \pm 10$	0,33	2,10	12º dia	0,13
T 50% ENR	$5,37 \times 10^9 \pm 16$	0,82	0,85	5º dia	0,25

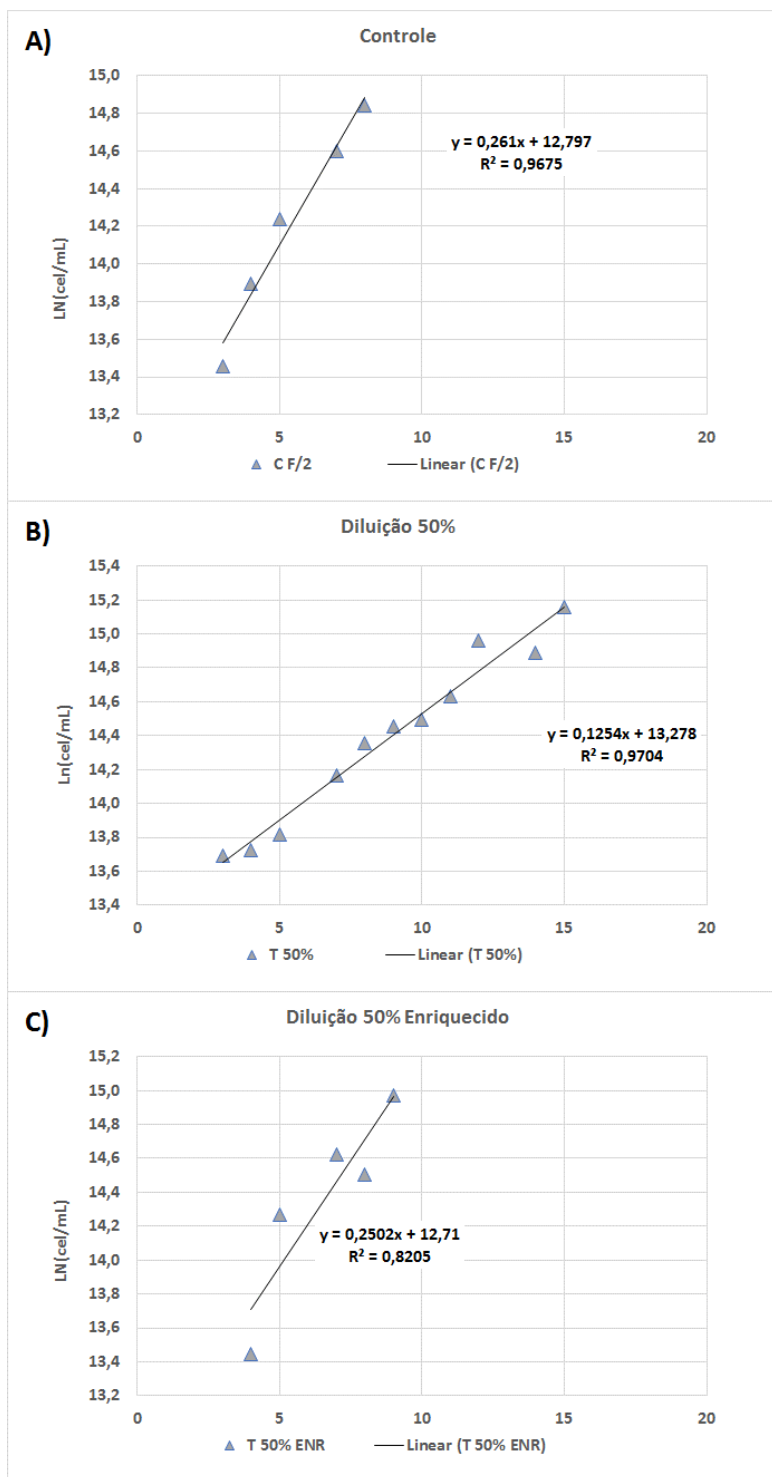


Figura 12. Taxas de crescimento celular (μ) na fase exponencial, em dias, no experimento 2, para A) controle C F/2; B) T 25%; C) T 50%. Valores calculados segundo a metodologia de Fogg & Thake (1987). Fonte: Autoria própria.

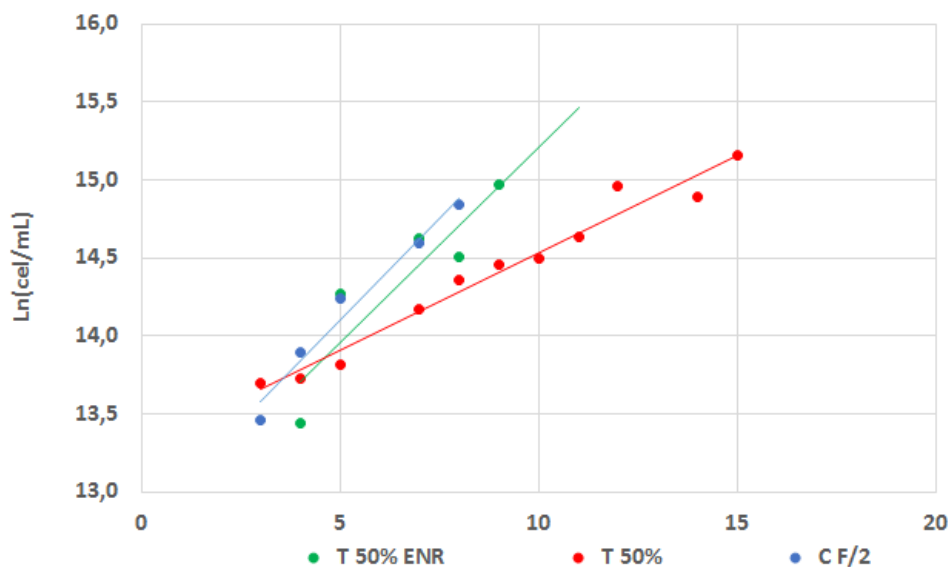


Figura 13. Taxas de crescimento celular (μ) ao longo do tempo, em dias, no experimento 2, para o controle e os tratamentos. Valores calculados segundo a metodologia de Fogg & Thake (1987).
Fonte: Autoria própria.

Os resultados das análises de pigmentos apontaram que a biomassa algal de C F/2 apresentou, em média, 1,82 mg/L do pigmento clorofila *a*, 0,29 mg/L de clorofila *b* e 1,92 mg/L de carotenoides, enquanto que os tratamentos T 50% e T 50% ENR apresentaram em média, respectivamente, 4,31 mg/L e 6,97 mg/L de clorofila *a*, 0,93 mg/L e 1,07 mg/L de clorofila *b* e 3,16 mg/L e 4,36 mg/L de carotenoides (Tabela 6). Esses resultados demonstram que o tratamento com 50% de efluente enriquecido com metais e vitaminas apresentou tanto a maior densidade celular quanto as maiores concentrações de pigmentos e, conseqüentemente, uma proporção de pigmento/célula maior, demonstrando ser o tratamento onde houve o maior desenvolvimento e rendimento celular por parte da espécie *D. salina* (Tabela 7 e Figura 14).

Tabela 6. Média dos valores de pigmentos (Clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, em mg/L) e de densidade celular máxima (em cél/L) obtidas no experimento2, para o controle e os tratamentos.

	Densidade celular máx. (cél/L)	Clorofila <i>a</i> (mg/L)	Clorofila <i>b</i> (mg/L)	Carotenóides (mg/L)
C F/2	$4,87 \times 10^9 \pm 23$	1,82	0,29	1,92
T 50%	$4,08 \times 10^9 \pm 10$	4,31	0,93	3,16
T 50% ENR	$5,37 \times 10^9 \pm 16$	6,97	1,07	4,36

Tabela 7. Médias das proporções de pigmentos por célula, considerando clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides (em pg/cél), obtidas no experimento 2, para o controle e os tratamentos.

	Clorofila <i>a</i> /cél (pg/cél)	Clorofila <i>b</i> /cél (pg/cél)	Carotenóides/cél (pg/cél)
C F/2	0,37	0,06	0,39
T 25%	1,05	0,23	0,77
T 50%	1,30	0,20	0,81

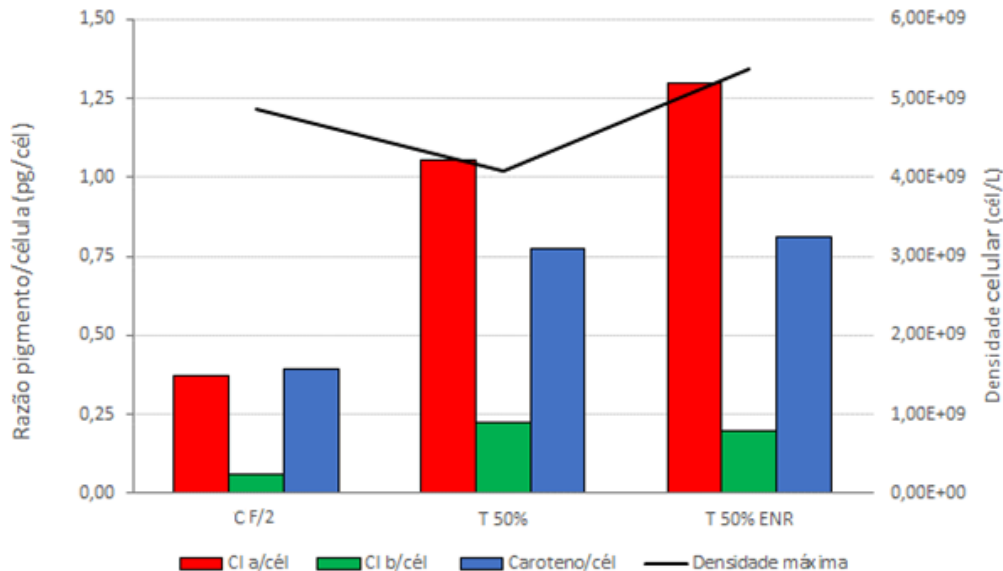


Figura 14. Densidade celular final (em cél/L) e proporções de pigmentos por célula, considerando clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, obtidas no experimento 2, para o controle e os tratamentos.
Fonte: Autoria própria.

O β -caroteno é um carotenoide do grupo dos hidrocarbonetos, ou seja, composto apenas por hidrogênio e carbono (DA FRÉ, 2016), que apresenta alta demanda de bioprospecção como corante natural de alimentos como a pró-vitamina A, aditivos para cosméticos, complexos multivitamínicos e suplemento alimentar animal como rações (MESQUITA, 2013). Assim como outros carotenoides, são sintetizados primariamente por microalgas sob condições normais e secundariamente sob condições de estresse como um mecanismo de defesa, dessa forma funcionando tanto como fotoprotetores quanto como pigmentos fotossintéticos secundários (DA FRÉ, 2016; FAZELI *et al.*, 2006; OROSA *et al.*, 2000; ABALDE *et al.*, 1991). É possível ainda encontrar β -caroteno em animais que se alimentam diretamente de plantas, macroalgas e microalgas que sintetizam esse carotenoide em grandes taxas, como por exemplo em flamingos, crustáceos e peixes herbívoros (MESQUITA, 2013). Na aquicultura, esse carotenoide comumente é adicionado à ração animal para suprir a deficiência de sua ocorrência natural no meio de cultivo animal (OGAWA *et al.*, 2007), e por esse motivo, um cultivo de *D. salina* que apresente alta produção e sintetização de β -caroteno pode vir a ser de grande interesse para o setor aquícola. Como os resultados do presente estudo mostraram, o tratamento com 50% de efluente diluído enriquecido apresentou as maiores taxas de carotenoides e a maior proporção pigmento por célula.

Estudos que avaliaram o potencial de produção de carotenoides em *D. salina*, como o estudo de Xu *et al.* (2018), observaram proporções de carotenoide por célula de até $5,30 \pm 1,5$ pg/cél, proporções maiores do que as encontradas no presente estudo, assim como ocorreu no estudo de Alshareed & Sayegh (2016) que evidenciou em seu estudo proporções de carotenoide por célula de $1,13 \pm 0,10$ pg/cél a $3,65 \pm 0,08$ pg/cél. Da Fré (2016), por sua vez, observou que a espécie *D. salina* é capaz de produzir valores próximos de 14% de β -caroteno em relação a sua biomassa seca; porém, alguns estudos apontam que a carotenogênese em microalgas dessa espécie pode ser induzida por fatores como luminosidade, salinidade, temperatura ou disponibilidade de nutrientes (EINALI *et al.*, 2017; TINOCO *et al.*, 2015; TAFRESHI & SHARIATI, 2009).

Xu & Harvey (2019), por exemplo, investigaram a influência de luminosidade LED na produção de carotenoides de *D. salina*, e seus resultados mostraram proporções de $24,5 \pm 1,3$ pg/cél em tratamentos sob a influência de LED avermelhada e $11,4 \pm 0,4$ pg/cél em tratamentos sob a influência de LED azulada, mostrando que em, um cultivo de *D. salina* voltado para a produção de carotenoides, condições externas e internas do cultivo podem ser alteradas para melhorar o desempenho e a produção.

Carotenóides em geral, principalmente o β -caroteno, apresentam atividade antioxidante e atividade indutora pró-vitamina A, podendo ser empregados no combate à deficiência dessa vitamina, além de outras atividades biológicas que são atribuídas a esse grupo de pigmentos, como auxiliar no fortalecimento do sistema imunológico e no combate a doenças degenerativas e cardiovasculares, segundo informações da Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos (RODRIGUES-AMAYA, 2008).

Na aquicultura, além dessas qualidades que atuam na saúde dos animais cultivados, Shahidi & Brown (1998) ainda conferem aos carotenoides qualidades como atuar na redução de tumores, Okada *et al.* (1994) mostra que carotenoides são responsáveis por aumentar a coloração da carne e da carapaça de crustáceos, e Ponce-Palafox *et al.* (2006) apresentam potenciais qualidades como melhorar o crescimento e maturação de espécies e aumentar a tolerância dos animais cultivados a ambientes com excesso de amônia e baixos níveis de oxigênio. Por isso, autores como Grung *et al.* (1993) indicam que os carotenoides são essenciais e devem ser inseridos em dietas alimentares para organismos aquícolas, sendo vantajoso utilizar esse tipo de pigmento como suplementação alimentar em rações a fim de melhorar o alimento produzido, tornando mais interessante comercialmente, e suprir a deficiência natural desses pigmentos no meio de cultivo (OGAWA *et al.*, 2007; PONCE-PALAFOX *et al.*, 2006).

Análises estatísticas realizadas apontaram que os tratamentos C F/2 ($w=0.97$, $p=0.87$), T 50% ($w=0.92$, $p=0.18$) e T 50% ENR ($w=0.96$, $p=0.65$) seguem uma distribuição normal e são comparáveis. Com isso, a Figura 15 apresenta uma análise através de gráfico boxplot onde é possível observar que C F/2 e T 50% ENR apresentaram as maiores amplitudes de gráfico, simbolizando as maiores densidades celulares nesses tratamentos.

Ainda, é possível notar na Figura 15 que T 50% e T 50% ENR apresentaram assimetrias em suas medianas, considerando a distribuição de dados, sendo a assimetria de T 50% mais negativa e a de T 50% ENR mais positiva e mostrando o bom desenvolvimento da cultura algal neste tratamento, confirmada pela alta taxa de crescimento da fase exponencial de $0,25 \text{ dia}^{-1}$ e demonstrando ser um tratamento propício para o crescimento da cultura.

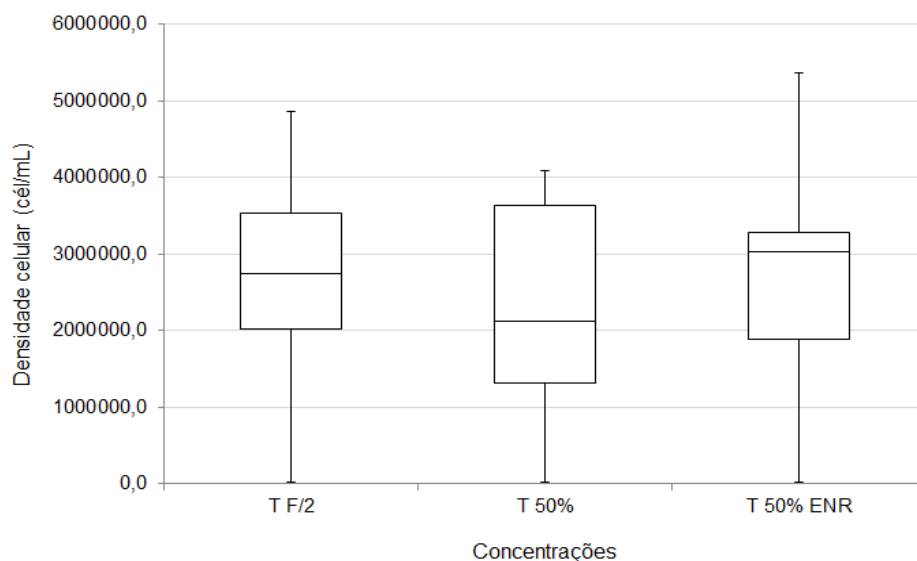


Figura 15. Boxplot da variação de densidade celular, obtidas no experimento 2, para o controle e os tratamentos. Fonte: Autoria própria.

No que diz respeito à análise de nutrientes nitrogenados, os resultados apontaram que o efluente bruto tirado dos tanques de carcinicultura apresentou nitrato em grande concentração, sendo obtido o valor de $11,57 \text{ mg/L}$ durante as análises, e nitrito e amônia em menores teores, com valores de $0,10 \text{ mg/L}$ e $0,01 \text{ mg/L}$ respectivamente (Tabela 8). Ao fim dos experimentos, foi constatado que, apesar da taxa de nitrato ter diminuído em todos os tratamentos, apresentando como valores finais médios $6,80 \text{ mg/L}$ em C F/2 (cerca de 41% de redução), $4,14 \text{ mg/L}$ em T 25% (cerca de 64% de redução), $5,62 \text{ mg/L}$ em T 50% (cerca de 51% de redução) e $6,11$ em T 50% ENR (cerca de 47% de redução), ambos os valores médios de amônia e de nitrito aumentaram significativamente no meio controle e nos tratamentos, como pode ser visto na Tabela 8.

Essa diminuição do nitrogênio em forma de nitrato pode ser explicado pelo consumo por parte das células, visto que sua concentração inicial no efluente bruto já era bem, porém, o aumento do nitrogênio em forma de nitrito e amônia se diferencia de resultados observados na literatura, que indicam uma diminuição nessas formas também (HOLANDA, 2017; SILVA, 2017; WEN *et al.*, 2017). Ainda, estudos como os de Holanda (2017), Silva (2017) e Wen *et al.* (2017) evidenciaram que, em um cultivo, conforme os nutrientes nitrogenados passam a ser consumidos e sua disponibilidade diminui, a taxa de crescimento celular sofre uma desaceleração, o que também se difere em parte dos resultados observados no presente estudo, dado o aumento dos valores médios de nitrito e amônia alinhado a um maior crescimento celular.

Tabela 8. Valores médios de nutrientes nitrogenados (nitrato, nitrito e amônia, em mg/L), obtidas do efluente bruto pré-experimento e ao fim dos experimentos, para o meio controle e os demais tratamentos.

	Nitrato (mg/L)	Nitrito (mg/L)	Amônia (mg/L)
Efluente Bruto	11,57	0,10	0,01
C F/2	6,80	0,86	0,53
T 25%	4,14	0,82	1,30
T 50%	5,62	0,87	1,39
T 50% ENR	6,11	0,61	1,16

No cultivo de organismos aquáticos, as fontes de nutrientes nitrogenados inorgânicos são a metabolização dos aminoácidos e proteínas dos organismos cultivados, o emprego de fertilizantes nitrogenados e a decomposição de resíduos orgânicos, como biomassa morta, excretas dos organismos, sobras de ração e adubos orgânicos por bactérias (KUBTIZA, 2018). Desses nutrientes, a amônia é a forma de excreção principal de resíduos nitrogenados e a forma nitrogenada preferida para assimilação por microalgas por representar um menor gasto energético para absorção; porém, o nitrato é a forma mais assimilada e em taxas maiores por ter maior abundância e estabilidade no meio de cultivo (HOLANDA, 2017; LOURENÇO, 2006; ITAIPU BINACIONAL, 2006).

O nitrito, por sua vez, é produzido através da oxidação da amônia e é a forma nitrogenada mais tóxica para organismos cultivados pois, quando em contato com a hemoglobina do sangue desses organismos, pode dificultar o transporte de oxigênio e causar a morte animal, sendo absorvida pelo fitoplâncton em baixas concentrações (HOLANDA, 2017; ITAIPU BINACIONAL, 2006).

Segundo o artigo de Kubtiza (2018), em cultivos aquícolas o nitrato se encontra na forma iônica de NO_3^- , a amônia pode estar presente como íon NH_4^+ ou como gás NH_3 - sendo mais tóxica quando em grandes concentrações de NH_3 por conseguir realizar difusão através de membranas celulares mais facilmente devido a seu menor tamanho - , e o nitrito, por sua vez, pode ser encontrado na forma de ácido nitroso HNO_2 e na forma de íon nitrito NO_2^- . Considerando a possível toxicidade desses compostos, são indicados como níveis de atenção para o cultivo de crustáceos aquícolas 0,06 a 0,10 mg/L de NH_3 , 2 a 23 mg/L de NO_2^- e 620mg/L de NO_3^- (KUBTIZA, 2018).

Apesar dos valores de nitrato e nitrito estarem abaixo dos níveis de atenção propostos pelo autor, os valores de amônia se encontraram bem acima desses níveis (Tabela 8). Esse aumento de amônia nos meios de tratamento pode ter sido ocasionado pela decomposição das células mortas por parte das bactérias, fazendo com que ocorra liberação de nitrogênio amoniacal no sistema (BESOLD, 2015), o que pode ser um fator negativo no possível reaproveitamento da água tratada por *D. salina* no próprio sistema de cultivo aquícola por meio da recirculação e na possível aplicação dessa espécie de microalga na biorremediação de nitrogênio amoniacal do efluente BFT. Entretanto, os parâmetros encontrados para o nitrogênio amoniacal atendem o valor de 20,0 mg/L proposto pela Resolução CONAMA 430/2011 (MMA, 2011) e os de nitrato e nitrito atendem os valores de 10,0 mg/L e 1,0 mg/L, respectivamente, propostos pela Resolução CONAMA 357/2005 (MMA, 2005) como valores máximos padrões para lançamento de efluentes em corpos hídricos, indicando que o efluente pós-tratamento por *D. salina* pode ser descartado em corpos hídricos adequadamente.

No que diz respeito à análise da viabilidade de cultivo de *D. salina* em efluente BFT, ao se comparar as taxas obtidas no tratamento T 50% ENR - tratamento este que melhor promoveu o desenvolvimento da cultura algal - com a de outros estudos que se propuseram a investigar as taxas de crescimento celular e de densidade celular de *D. salina* em diferentes meios, objetivando comprovar a eficiência do tratamento em questão no cultivo de biomassa algal dessa espécie, nota-se que os valores obtidos foram muito próximos dos descritos na literatura.

No estudo de Helena *et al.* (2016) por exemplo, que se propôs a cultivar a espécie *D. salina* em água salobra e sob diferentes influências de luminosidade LED, foi encontrado o valor de $8,50 \times 10^{-9}$ cél/L como densidade celular máxima em tratamentos sob influência de luz LED avermelhada e $5,77 \times 10^{-9}$ cél/L para tratamentos sob influência de luz LED azulada, mostrando não apenas valores próximos aos observados no presente estudo como também mostrando que o cultivo de *D. salina* pode ser incrementado a partir de mudanças nas condições e parâmetros de cultivo.

No mesmo contexto, o estudo de Abu-Rezq *et al.* (2010) se propôs a avaliar não apenas a influência da luminosidade no cultivo de *D. salina* em meio controle, mas também avaliou diferentes salinidades, temperaturas, fatores nutricionais e injeção de CO₂ nos tratamentos, e seus resultados apontaram que houve uma densidade celular maior em tratamentos com maior salinidade e menor temperatura, atingindo taxas de $2,90 \times 10^{-9}$ cél/L na temperatura de 20°C e salinidade de 45 e de $2,40 \times 10^{-9}$ cél/L na temperatura de 32°C e mesma salinidade. No que diz respeito à influência dos fatores de luminosidade e injeção de CO₂ nos tratamentos, os autores notaram que as cepas da espécie *D. salina* apresentaram taxas de densidade celular de $4,59 \times 10^{-9}$ cél/L em tratamentos com alta luminosidade (18×10^3 lux) e pH 9,18 e de $4,49 \times 10^{-9}$ cél/L em tratamentos com a mesma luminosidade e pH 9,17, e quando se reduz o pH para 6,75 e 7,25 ocorre uma diminuição na densidade celular máxima, caindo para $2,73 \times 10^{-9}$ cél/L para pH 6,75 e $1,81 \times 10^{-9}$ cél/L para pH 7,25 (ABU-REZQ *et al.*, 2010). Com isso, os autores puderam concluir que as melhores condições para cultivo em meio controle são altas salinidades acima de 45, temperaturas por volta de 20°C, alta luminosidade e alto pH, ou seja, sem adição de CO₂ por injeção (ABU-REZQ *et al.*, 2010).

Como visto, as concentrações de nutrientes inorgânicos nitrogenados sofreram um aumento durante o período de experimentos, com exceção do nitrato, que apresentou redução, o que pode indicar que o efluente BFT não apresenta limitação nutricional por parte desses tipos de nutrientes, e como o experimento 2 mostrou, com o enriquecimento do efluente com uma solução formada de vitaminas e metais traço, a densidade celular e a produção de pigmentos sofreu um aumento. Esses resultados indicam que o efluente BFT pode apresentar uma possível limitação nutricional de componentes presentes nessa solução, que, segundo Andersen (2005), pode conter vitaminas B₁ (tiamina), B₇ (biotina), B₁₂ (cianocobalamina), sais de cloreto ou sulfato de zinco, cobalto, manganês, selênio, zinco, boro e ferro na forma de cloreto férrico ou sulfato ferroso.

Dentro desse contexto, Abreu *et al.* (2016) se propuseram a avaliar não somente a influência de efluentes BFT no cultivo da microalga *Navicula sp.* em comparação com um meio controle, mas também a influência da adição de metais traços no efluente BFT. Nesse estudo, foram realizadas um meio controle Conway e quatro tratamentos com diferentes diluições de efluente, 25% de efluente, 50%, 75% e 100% de efluente integral, e seus resultados apontaram que a adição de metais traço incrementou o crescimento celular e resultou em uma maior densidade celular máxima em todos os tratamentos, com exceção do tratamento com 75% de efluente diluído, além de diminuir consideravelmente o tempo de duplicação celular e aumentar ou manter igual a velocidade de crescimento dos cinco tratamentos (ABREU *et al.* 2016).

Apesar do aumento de nitrogenados nos tratamentos, foi observado que o tratamento T 50% ENR, além de apresentar uma densidade celular máxima maior durante o período de experimentos ($5,37 \times 10^9 \pm 16$ cél/L) e uma menor taxa de duplicação celular em um mesmo período de tempo (0,85 G; dia⁻¹) quando comparado com os demais tratamentos, apresentou também as maiores proporções pigmento/célula (1,30 pg/cél para clorofila *a*, 0,20 pg/cél para clorofila *b* e 0,81 pg/cél para carotenoides) e o maior rendimento celular, além de apresentar uma taxa de crescimento para a fase exponencial muito próxima da obtida no meio controle F/2 (que foi de 0,26 dia⁻¹, em comparação com a de 0,25 dia⁻¹ obtida em T 50% ENR).

A taxa de crescimento observada em T 50% ENR também foi semelhante a aquelas obtidas em dados da literatura, como no estudo de Alshareed & Sayegh (2016), que encontrou taxas de crescimento de 0,183 e 0,143 para tratamentos empregando meio controle de Johnson e água residuária de estações de dessalinização. Dessa forma, o tratamento T 50% ENR se tornou, sob a ótica dos resultados obtidos dos experimentos, o meio mais propício para o desenvolvimento da espécie *D. salina*, demonstrando uma possível limitação do efluente BFT no que diz respeito à disponibilidade natural de vitaminas e metais traço no meio, mas também demonstrando seu potencial de aplicação como meio de cultivo para a espécie de microalga selecionada, em especial para o cultivo focado na produção de carotenoides como o β -caroteno que poderiam ser aproveitados como suplementação alimentar para os camarões cultivados.

Conclusão

O efluente bruto proveniente de tanques de cultivo BFT foi caracterizado em parâmetros de nutrientes nitrogenados inorgânicos, apresentando teores de 11,57 mg/L de nitrato, 0,10 mg/L de nitrito e 0,01 mg/L de amônia.

Durante o experimento 1, onde foi avaliado crescimento de *D. salina* empregado 25% e 50% de efluente diluído em relação a um controle com meio Guillard F/2, o controle apresentou maiores valores densidade celular máxima ($5,19 \times 10^9 \pm 21$) e de teores de pigmentos, sendo estes de 0,92 mg/L de clorofila *a* (0,18 pg/cél), 0,26 mg/L de clorofila *b* (0,05 pg/cél) e 1,04 mg/L de carotenoides (0,20 pg/cél).

Durante o experimento 2, onde foi avaliado o crescimento de *D. salina* com 50% de efluente diluído em sua forma integral e 50% de efluente diluído enriquecido com vitaminas e metal traço em relação a um controle com meio Guillard F/2, o tratamento com 50% de efluente enriquecido apresentou densidade celular máxima de $5,37 \times 10^9 \pm 16$ e de teores de pigmentos de 6,97 mg/L de clorofila *a* (1,30 pg/cél), 1,07 mg/L de clorofila *b* (0,20 pg/cél) e 4,36 mg/L de carotenoides (0,81 pg/cél), sendo esses valores maiores do que os obtidos no meio controle e nos demais tratamentos. Com isso, esse tratamento se mostrou o mais propício para o desenvolvimento da microalga *Dunaliella salina*, demonstrando a viabilidade e o potencial de aplicação do efluente BFT a ser empregado como meio de cultura, em especial quando enriquecido com soluções aditivas de vitaminas e metais traço, considerando uma possível limitação do efluente BFT no que diz respeito à disponibilidade natural de vitaminas e metais traço no meio.

Os resultados demonstraram que os valores obtidos para a fitorremediação de todos os tratamentos respeitam os valores máximos padrões previstos nas Resoluções CONAMA 357/2005 (MMA, 2005) e CONAMA 430/11 (MMA, 2011) para lançamento de efluentes em corpos hídricos, tornando viável a fitorremediação do efluente BFT com a espécie *Dunaliella salina* (BMAK 116) para fins de descarga do efluente em corpos hídricos adequados.

Sugere-se que em experimentos futuros sejam implantadas novas análises durante os experimentos, tanto para a caracterização do meio efluente – em especial análises de ortofosfato, de metais e da comunidade microbiana no efluente, com foco em bactérias nitrificantes – quanto para parâmetros bióticos – como pesagem da biomassa seca. Ainda, sugere-se também que sejam investigados e desenvolvidos experimentos acerca de extração de carotenoides e outros compostos de interesse aquícola comercial da biomassa de *D. salina* cultivada, estudando sua eficiência e viabilidade de extração e de aplicação. Entretanto, ainda assim os resultados obtidos no presente estudo demonstram o potencial de aplicação do efluente BFT a ser empregado como meio de cultura quando enriquecido com soluções aditivas de metais traço e vitaminas que possivelmente não se encontram em concentrações necessárias para o crescimento celular no efluente puro.

Referências Bibliográficas

ABALDE, J.; FABREGAS, J.; HERRERO, C. B-Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*, v. 38, n. 2-3, p. 121-125, 1991.

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 19, pp. 257-275.

ABREU, J.L.; BRITO, L.O.; MORAES, L.B.S.; SILVA, D.L.B.; BARBOSA, S.M.S.; GALVEZ, A.O. Utilização do resíduo sólido de cultivo de camarão em sistema de bioflocos para produção da microalga *Navicula* sp. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 42(4): 780-790, 2016.

ABU-REZQ, T.S.; AL-HOOTI, S.; JACOB, D.A. Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. *J. Algal Biomass Util.* 2010, 1(2): 12-19.

ALSHAREEF, M.O.; SAYEGH, F.A. Cultivation technique of *Dunaliella salina* using partially treated sewage water and discharged desalination water. *Nature and Science*, 2016, 14(8): 142-150.

ANDERSEN, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA. 1st edition.

AVNIMELECH, Y. 2009. *Biofloc Technology – A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA. 182 p.

AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. A. S. *Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: IDSM, 2007. 364p.

BAUMGARTEN, M.G.Z.; ROCHA, J.M.B.; NIENCHESKI, L.F.H. 1996. *Manual de análises de oceanografia química*. Editora da FURG. Rio Grande, 164 p.

BEN-AMOTZ, A.; POLLE, J. E. W.; RAO, D. V. S. The Alga *Dunaliella*. Enfield: Science publishers, 2009, 555 p.

BENDSCHNEIDER, K.; ROBINSON, R.J. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *Journal of Marine Research*, v.11, p.87-96, 1952.

BESOLD, C. 2015. Cultivo da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* em efluente da produção de camarão em sistema BFT. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande – UFRG. 55 p.

CAI, T.; PARK, S.Y.; RACHARAKS, R.; LI, Y. 2013. Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production. *Applied Energy*, 108: 486–492.

CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. 2011. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(4): 542-549.

CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances*. v.25, p.294-306.

CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356–357: 351–356.

DA FRÉ, N.C. Influência das condições de cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* na produção de carotenoides e lipídios. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, 2016.

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. 2006. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência rural*, 36(6): 1959-1967.

EINALI, A.; MAZANG-GHASEMI, S.; VALIZADEH, J.; NOOROZIFAR, M. Metabolic Responses and B-carotene production by the unicelular green algae *Dunaliella salina* exposed to leaf extracts. *Acta Botanica Brasilica*, 31(2): 180-190, 2017.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2006. The State of World Fisheries and Aquaculture.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2008. Fisheries and Aquaculture Department. Statistics.

FAZELI, M. R.; TOFIGHI, H.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H. Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia Salt Lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 18, p. 2453-2456, 2006.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. 2011. Lipid Production of *Chlorella vulgaris* Cultured in Artificial Wastewater Medium. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 101–105.

FÓES, G.K.; GAONA, C.A.P.; PPOERSCH, L.H. 2012. Cultivo em bioflocos (BFT) é eficaz na produção intensiva de camarões. *Segmentos da Aquicultura. Visão Agrícola* nº 11.

FOGG, G.E.; THAKE, B. 1987. *Algae cultures and phytoplankton ecology*, 3rd edition. The Univessity of Wisconsins Press, Ltd., London, 269p.

FORMIGHIERI, C.; FRANCK, F.; BASSI, R. 2012. Regulation of the pigment optical density of an algal cell: filling the gap between photosynthetic productivity in the laboratory and in mass culture *J. Biotechnol*, 162: 115–123.

GRASSHOFF, K.M.; EHRHARDT, K.; KREMLING, K. 1983. *Methods of seawater analysis*. Second, revised and extended edition. Weinheim; Deerfield Beach, Florida; Basel: Verlag Chemie. 419 p.

GRUNG, M., SVENDSEN, Y.S., LIAAEN-JENSEN, S. 1993. The carotenoids of eggs of wild and farmed cod. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106B, 237-242.

GUILLARD, R.R.L.; RYTHER, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* (Hustedt), and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian journal of microbiology, v. 8(2): 229-239.

HELENA, S.; ZAINURI, M.; SUPRIJANTO, J. Microalgae *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) Growth using the LED Light (Light Limiting Dioda) and Different Media. Aquatic Procedia 7, 2016, 226 – 230.

HOLANDA, C.L.B. Cultivo da microalga *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) em efluente de carcinicultura e seu efeito na qualidade de água, produção de lipídeos e exopolissacarídeos. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará (UFC). Fortaleza, 2017.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. 2010. Biodiesel Production by Microalgal Biothechnology, Applied Energy. v. 87, p. 38-46.

ITAIPU BINACIONAL. Boas Práticas de Manejo em Aquicultura. Instituto Água Viva, Itaipu Binacional, Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. 107p., 2006.

JEFFREY, S.W.; HUMPHREY, G.F. 1975. New espectrofotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algal and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Planzen (BPP) Bd.167 S 191-194.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. Applied Energy, 88: 3336-3341.

KOROLEFF, F. 1969. Direct determination of ammonia in natural Waters as indophenol blue. I.C.E.S. C.M. 1969/C: 9 (mimeo.): 4 pp.

KRUMMENAUER, D.; PEIXOTO, S.; CAVALLI, R.O.; POERSCH, L.H.; WASIELESKY Jr, W. 2011. Superintensive Culture of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a Biofloc Technology System in Southern Brazil at Different Stocking Densities. Journal of the world aquaculture society, 42: 726- 733.

KRUMMENAUER, D.; SEIFERT Jr, C.A.; POERSCH, L.H.; FOES, G.K.; LARA, G.R.; WASIELESKY Jr, W. 2012. Cultivo de camarões marinhos em sistema de bioflocos: Análise da reutilização da água. Atlântica, 34(2): 103-111.

KUBITZA, F. O impacto da ammonia, do nitrito e do nitrato sobre o desempenho e a saúde dos peixes e camarões. A água na aquicultura, Parte 3. Revista Panorama da Aquicultura, ed. 165. 2018.

LORENZEN, C.J. 1967. Determination of chlorophyll and phaeopigment: spectrophotometric equations. Limnol. Oceanogr., 12:343-346.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. p. 606.

MAGNOTTI, C. C. F.; LOPES, R.; DERNER, R. E VINATEA, L. 2016 Using residual water from a marine shrimp farming BFT system. part I: nutrient removal and marine microalgae biomass production. Aquaculture Research, 47: 2716–2722

MESQUITA, S.S. Avaliação de estratégias para a indução da produção de B-caroteno por *Dunaliella bardawil*. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, 2013.

MESQUITA, S.S.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; SERVULO, E.F.C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. Rev. Virtual Quim., 2017, 9(2): 672-688.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Publicada no D.O.U. nº 053, de 18 de março de 2005, págs. 58-63.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Publicado no D.O.U. nº 92, de 16 de maio de 2011, pág. 89.

NETO, C.R.L.A.L.; SILVA, P.E.C.; BEZERRA, R.P.; MARQUES, D.A.V.; NEVES, A.L.S.; NETO, N.S.O.; CARVALHO, J.C.M.; PORTO, A.L.F. Effects of different cultures medium on *Dunaliella tertiolecta* growth. 52º Congresso Brasileiro de Química – CBQ, Área: Bioquímica e Biotecnologia. Recife, 2012

OGAWA, M.; MAIA, E.L.; FERNANDES, A.C.; NUNES, M.L.; OLIVEIRA, M.E.B.; FREITAS, S.T. Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenoides. Ciênc. Tecnol. Aliment., 2007, 27(2): 333-337.

OKADA, S., NUR, E., BORHAN, S.A., WATANABE, S., YAMAGUCHI, K. 1994. Pigmentation of culture black tiger prawn by feeding a *Spirulina* supplemented diet. Third International Marine Biotechnology Conference, Tromsø, Norway. P. 61.

OROSA, M.; TORRES, E.; FIDALGO, P.; ABALDE, J. Production and analysis of secondary carotenoids in green alga. Journal of Applied Phycology, v. 12, n. 3-5, p. 553-556, 2000.

PARSONS, T.R., MAITA, Y. AND C.M. LALLI, 1984. A manual of chemical and biological methods for sea water analysis. Pergamon Press, Oxford.

PATIL, J.S.; ANIL, A.C. 2005. Biofilm diatom community structure: influence of temporal and substratum variability. Biofouling, 21: 189–206.

PITTMAN, J.K.; DEAN, A.D.; OSUNDEKO, O., 2011. The Potential of Sustainable Algal Biofuel Production Using Wastewater Resources. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 17–25.

PONCE-PALAFOX, J.T.; ARREDONDO-FIGUEROA, J.L., VERNON-CARTER, E.J. 2006. Carotenoids from plants used in diets for the culture of the Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, Vol. 5, 157-165.

RENAULD, S.M.; PARRYLA, D.L.; THINH, L.V.; KUO, C.; PADOVANLA, A.; SAMMY, N. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis sp.* and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 3:43-53.

RODRIGUES-AMAYA, D.B. 2008. Fontes brasileiras de carotenóides: Tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos. Délia B. Rodrigues-Amaya, Mieko Kimura e Jaime Amaya-Farfan [autores]; Lidio Coradin e Vivian Beck Pombo [organizadores]. Brasília: MMA/SBF, 2008. 100 p.: il. Color.; 25cm

SAMOCHA, T.M.; LAWRENCE, A.L.; COLLINS, C.A.; CASTILLE, F.L.; BRAY, W.A.; DAVIES, C.J.; LEE, P.G.; WOOD, G.F. 2004. Production of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in high-density greenhouse-enclosed raceways using low salinity groundwater. *Aquaculture*, 15: 1-19.

SCHNEIDER, O.; SERETI, V.; EDING, E.H.; VERRETH, J.A.J. 2005. Analysis of nutrient flows in integrated intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 32: 379–401.

SHAHIDI, F.; BROWN, J. A. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Critical Reviews in Food Science* 1998, 38, 1,1.

SILVA, J.W.A. Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em efluentes aquícolas e sua influência na concentração lipídica. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros, Universidade Federal do Ceará (UFC). Fortaleza, 2013.

SILVA, J.W.A. Fitorremediação de efluentes aquícolas e extração de lipídios para a produção de biodiesel utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará (UFC). Fortaleza, 2017.

TAFRESHI, A.H.; SHARIATI, M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology, 2009, 107: 14-35.

TAFRESHI, A.H.; SHARIATI, M. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for B-carotene production in open ponds in the central region of Iran. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 22: 1003-1006.

TAHIM, E.F. 2014. A Carcinicultura E o Meio Ambiente: o desafio da sustentabilidade. Apresentação Oral - Agropecuária, Meio-Ambiente, e Desenvolvimento Sustentável. 52º Congresso da SOBER – Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural.

TINOCO, N.A.B.; TEIXEIRA, C.M.L.L.; REZENDE, C.M. O Gênero *Dunaliella*: Biotecnologia e Aplicações. Rev. Virtual Quím., 2015, 7(4): 1421-1440.

TORRES, H. S. J. 2014. Cultivo de Microalgas em Efluente de Tratamento Anaeróbico de Esgoto. Tese do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo.

TROELL, M.; NAYLORC, R.L.; METIAN, M.; BEVERIDGED, M.; TYEDMERSE, P.H.; FOLKEA, C.; ARROWF, K.J.; BARRETTG, S.; CRÉPINA, A.S.; EHRLICHH, P.R.; GRENA, A.; KAUTSKYI, N.; LEVINJ, S.A.; NYBORGK, K.; ÖSTERBLOM, H.; POLASKYL, S.; SCHEFFERM, M.; WALKERN, B.H.; XEPAPADEASO, T.; ZEEUWP, A. 2014. Does aquaculture add resilience to the global food system? PNAS, 111 (37): 13257–13263.

WANG, B.; LI, B.; WU, N.; LAN, C. Q. 2008. CO₂ Bio-Mitigation using Microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 79, p. 707–718.

WEN, Y.; HE, Y.; JI, X.; LI, S.; CHEN, L.; ZHOU, Y.; WANG, M.; CHEN, B. Isolation of an indigenous *Chlorella vulgaris* from swine wastewater and characterization of its nutrient removal ability in undiluted sewage. *Bioresource Technology*, London, v. 243, p. 247-253, 2017.

XU, Y.; HARVEY, P.J. Carotenoid Production by *Dunaliella salina* under Red Light. *Antioxidants*, 2019, 8(123).

XU, Y.; IBRAHIM, I.M.; WOSU, C.I.; BEN-AMOTZ, A.; HARVEY, P.J. Potential of New Isolates of *Dunaliella salina* for Natural B-Carotene Production. *Biology*, 2018, 7(14).